

Université de Montréal

**RÔLE ESSENTIEL DES CELLULES DENDRITIQUES DANS L'IMMUNITÉ INNÉE
FACE À DES STREPTOCOQUES ENCAPSULÉS**

par
PAUL LEMIRE

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Août 2014

© Paul Lemire, 2014

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée

**RÔLE ESSENTIEL DES CELLULES DENDRITIQUES DANS L'IMMUNITÉ INNÉE
FACE À DES STREPTOCOQUES ENCAPSULÉS**

Présentée par

PAUL LEMIRE

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Marcelo Gottschalk, président-rapporteur

Mariela Segura, directrice de recherche

Lucie Lamontagne, membre du jury

Tatiana Scorza, examinatrice externe

Carl A. Gagnon, représentant du doyen de la FÉSP

RÉSUMÉ

Streptococcus du Groupe B (GBS) et *Streptococcus suis* sont deux pathogènes encapsulés qui induisent des pathologies similaires dont la méningite et la septicémie chez les animaux et/ou les humains. Les sérotypes III et V du GBS et les sérotypes 2 et 14 du *S. suis* (utilisés dans cette étude) sont parmi les plus prévalents et/ou les plus virulents. La capsule polysaccharidique (CPS) définit le sérotype et est considérée comme un facteur de virulence essentiel pour les deux espèces bactériennes.

Malgré que plusieurs études aient été réalisées au niveau des interactions entre ces streptocoques et les cellules de l'immunité innée, aucune information n'est disponible sur la régulation de la réponse immunitaire contre ces pathogènes par les cellules dendritiques (DCs) et leur interactions avec d'autres cellules, notamment les cellules 'natural killer' (NK). Dans cette étude, différentes approches (*in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*) chez la souris ont été développées pour caractériser les interactions entre les DCs, les cellules NK et GBS ou *S. suis*. L'utilisation de mutants non encapsulés a permis d'évaluer l'importance de la CPS dans ces interactions.

Les résultats *in vitro* avec les DCs infectées par GBS ou *S. suis* ont démontré que ces deux pathogènes interagissent différemment avec ces cellules. GBS est grandement internalisé par les DCs, et ce, via de multiples mécanismes impliquant notamment les radeaux lipidiques et la clathrine. Le mécanisme d'endocytose utilisé aurait un effet sur la capacité du GBS à survivre intracellulairement. Quant au *S. suis*, ce dernier est très faiblement internalisé et, si le cas, rapidement éliminé à l'intérieur des DCs. GBS et *S. suis* activent les DCs via différents récepteurs et favorisent la production de cytokines et chimiokines ainsi que l'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation. Cette activation permet la production d'interferon-gamma (IFN- γ) par les cellules NK. Cependant, GBS semble plus efficace à activer les DCs, et par conséquent, les cellules NK que *S. suis*. La production d'IFN- γ , en réponse à la stimulation bactérienne, est principalement assurée par un contact direct entre les DCs et les cellules NK et ne dépend qu'en partie de facteurs solubles. De plus, nos résultats *in vivo* ont démontré que ces deux streptocoques induisent rapidement la libération d'IFN- γ par les cellules NK lors de la phase aiguë de l'infection. Ceci suggère que les interactions entre les DCs et les cellules NK pourraient jouer un rôle dans le

développement d'une réponse immune T auxiliaire de type 1 (T 'helper' 1 en anglais; Th1). Cependant, la capacité de *S. suis* à activer la réponse immunitaire *in vivo* est également plus faible que celle observée pour GBS. En effet, les CPSs de GBS et de *S. suis* jouent des rôles différents dans cette réponse. La CPS de *S. suis* empêche une activation optimale des DCs et des cellules NK alors que c'est l'opposé pour la CPS de GBS, indépendamment du sérotype évalué.

En résumé, cette étude adresse pour la première fois la contribution des DCs et des cellules NK dans la réponse immunitaire innée lors d'une infection à GBS ou à *S. suis* et, par extension, dans le développement d'une réponse Th1. Nos résultats renforcent davantage le rôle central des DCs dans le contrôle efficace des infections causées par des bactéries encapsulées.

Mots-clés : *Streptococcus* du Groupe B, *Streptococcus suis*, capsule polysaccharidique, cellules dendritiques, cellules 'natural killer', souris, réponse Th1, cytokines, endocytose, récepteurs.

ABSTRACT

Group B *Streptococcus* (GBS) and *Streptococcus suis* are two encapsulated pathogens that induce similar pathologies, including septicemia and meningitis in animals and/or humans. Serotypes III and V of GBS and serotypes 2 and 14 of *S. suis* (evaluated in this study) are the most prevalent and/or virulent types. The capsular polysaccharide (CPS) defines the serotype and is considered as a key virulence factor for both bacterial species.

Although several studies have addressed the interactions of these streptococci and various cells of the innate immune system, no information is available on the regulation of the immune response against these pathogens by dendritic cells (DCs), and their interactions with other cells, including natural killer (NK) cells. In this study, different approaches (*in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*) in mice were developed to characterize the interactions between DCs, NK cells and GBS or *S. suis*. Non-encapsulated mutants were used to evaluate the importance of the CPS in these interactions.

In vitro results with GBS- or *S. suis*-infected DCs showed that these two pathogens differently interact with these cells. GBS is largely internalized by DCs through multiple endocytosis mechanisms, mainly involving lipid rafts and clathrin. The use of a specific endocytosis pathway might help GBS to survive intracellularly. In contrast, *S. suis* is poorly internalized and, if the case, rapidly eliminated within the DCs. GBS and *S. suis* activate DCs through different receptors leading to the release of cytokines and chemokines and increased expression of co-stimulatory molecules. This activation allows the production of IFN- γ by NK cells. Yet, *S. suis* capacity to activate DCs and NK cells is lower than that observed for GBS. IFN- γ release in response to bacterial stimulation was mainly mediated by direct DC-NK cell contact and only partially dependant on soluble factors. In addition, our *in vivo* results showed that these two streptococcal species rapidly induce the release of IFN- γ by NK cells during the acute phase of the infection. This suggests that the DC-NK crosstalk might play a role in the development of a T helper 1 (Th1) response. Yet, *S. suis* capacity to activate the *in vivo* immune response was also lower than that observed for GBS. In fact, GBS and *S. suis* CPSs play different roles in this response. *S. suis* CPS prevents optimal activation of DCs and NK cells whereas it is the opposite for GBS, independently of the serotype tested.

In summary, this study addresses for the first time the contribution of DCs and NK cells to the innate immune response against GBS and *S. suis* infections, and by extension, to the development of a Th1 response. Our results further highlight the central role of DCs in the effective control of infections caused by encapsulated bacteria.

Keywords : Group B *Streptococcus*, *Streptococcus suis*, capsular polysaccharide, dendritic cells, natural killer cells, mice, Th1 response, cytokines, endocytosis, receptors

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xxii
REMERCIEMENTS	xxvii
 I – INTRODUCTION	 1
 II – REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	 6
1. Aspects généraux de <i>Streptococcus</i> du Groupe B	7
1.1 Historique et épidémiologie.....	7
1.2 Maladies et manifestations cliniques	8
1.2.1 Femmes enceintes.....	10
1.2.2 Nouveaux-nés et enfants	11
1.2.3 Adultes et personnes âgées avec une immunité compromise.....	12
1.3 Étapes de la pathogénèse et les facteurs de virulence associés	14
1.3.1 Facteurs de virulence.....	14
1.3.1.1 Capsule polysaccharidique : un facteur de virulence clé	15
1.3.1.2 Autres facteurs de virulence.....	18
1.3.2 Étapes de la pathogénèse	20
1.3.2.1 Colonisation: l'adhésion et l'invasion des surfaces épithéliales	21
1.3.2.2 Résistance à l'immunité innée et à l'élimination bactérienne.....	24
1.3.2.3 Réponse inflammatoire	28
1.3.2.4 Pénétration de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et méningite.....	29
2. Aspects généraux de <i>Streptococcus suis</i>	31
2.1 Historique et épidémiologie.....	31
2.2 Maladies et manifestations cliniques	32
2.2.1 Porc.....	32
2.2.2 Homme	34
2.3 Étapes de la pathogénèse et les facteurs de virulence associés	35

2.3.1 Facteurs de virulence.....	36
2.3.1.1 Capsule polysaccharidique : un facteur de virulence clé	36
2.3.1.2 Autres facteurs de virulence.....	38
2.3.2 Étapes de la pathogénèse	39
2.3.2.1 Colonisation: l'adhésion et l'invasion des surfaces épithéliales	40
2.3.2.2 Résistance à l'immunité innée et à l'élimination bactérienne.....	43
2.3.2.3 Réponse inflammatoire	45
2.3.2.4 Pénétration de la barrière hémato-encéphalique et méningite	46
3. Réponse immunitaire innée	49
3.1 Composants de la réponse immune	49
3.2 Complément.....	50
3.3 Voies d'internalisation des bactéries.....	51
3.3.1 Phagocytose	53
3.3.2 Endocytose dépendante de la clathrine (CME).....	55
3.3.3 Endocytose dépendante des cavéoles	56
3.3.4 Endocytose dépendante des radeaux lipidiques (indépendante de la clathrine et de la cavéoline)	58
3.3.5 Mécanismes d'évasion bactérienne	60
3.3.6 Mécanismes d'internalisation utilisés par GBS et par <i>S. suis</i>	62
3.4 Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires.....	63
3.4.1 Voie des récepteurs de type Toll (TLR)	64
3.4.2 Récepteurs de type 'nucleotide-binding oligomerization domain' (NOD).....	69
3.4.3 Autres récepteurs importants	71
3.5 Rôle des interactions DCs–cellules NK dans la réponse innée	76
3.5.1 Cellules dendritiques (DCs)	76
3.5.1.1 DCs murines	78
3.5.1.1.1 Origines et développement	78
3.5.1.1.2 Sous-populations de DCs murines.....	81
3.5.1.2 DCs humaines.....	84
3.5.1.3 Éléments clés de la maturation des DCs	86
3.5.1.3.1 Présentation de l'antigène par le CMH	87
3.5.1.3.2 Conséquences de la maturation des DCs.....	89
3.5.1.4 Rôles des DCs lors d'une infection à GBS et à <i>S. suis</i>	91
3.5.2 Cellules 'natural killer' (NK)	92

3.5.2.1 Développement des cellules NK	93
3.5.2.2 Sous-populations de cellules NK	96
3.5.2.3 Fonctions des cellules NK.....	98
3.5.2.4 Rôle des cellules NK lors d'infection bactérienne : implication dans les infections à GBS et à <i>S. suis</i>	100
3.5.3 Interactions entre les DCs et les cellules NK	102
3.5.3.1 Impact des signaux dans les interactions DCs-cellules NK	102
3.5.3.1.1 Rôle des cytokines	103
3.5.3.1.2 Rôle du contact cellule-cellule.....	104
3.5.3.2 Activation des cellules NK par les DCs	106
3.5.3.3 Maturation des DCs par les cellules NK.....	108
3.5.3.4 Lieux des interactions cellules DCs-cellules NK	108
3.5.3.4.1 Dans les tissus périphériques	108
3.5.3.4.2 Dans les organes secondaires lymphoïdes	109
3.5.3.5 Interactions DCs-cellules NK dans la réponse immune à une infection bactérienne : GBS et <i>S. suis</i>	110
III – MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS.....	111
ARTICLE I: Role of capsular polysaccharide in Group B <i>Streptococcus</i> interactions with dendritic cells.	112
ARTICLE II: Encapsulated Group B <i>Streptococcus</i> modulates dendritic cell functions via lipid rafts and clathrin-mediated endocytosis.	144
ARTICLE III: The NOD2 receptor does not play a major role in the pathogenesis of Group B <i>Streptococcus</i> in mice.	168
ARTICLE IV: The NOD2 receptor modulates the cytokine response but does not alter the clinical outcome of Group B <i>Streptococcus</i> -infected mice	185
ARTICLE V: Implication of TLR- but not NOD2-signalling pathways are involved in dendritic cell activation by Group B <i>Streptococcus</i> serotypes III and V	194

ARTICLE VI: Differential modulation of natural killer cell functions during the innate immune response to pathogenic streptococci. .	221
IV – DISCUSSION	259
V – CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES	290
VI – BIBLIOGRAPHIE	294
VII – ANNEXES	xiv
ARTICLE VII: Critical role for <i>Streptococcus suis</i> cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. .	xxx
ARTICLE VIII: Group B <i>Streptococcus</i> and <i>Streptococcus suis</i> capsular polysaccharides induce chemokine production by dendritic cells via Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent and -independent pathways. .	lv
ARTICLE IX: Exacerbated type II interferon response drives hypervirulence and toxic shock by an emergent epidemic strain of <i>Streptococcus suis</i>	lxxxviii
ARTICLE X: Group B <i>Streptococcus</i> induces a robust IFN- γ response by CD4 ⁺ T cells in an <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> model. .	cxxxi
ARTICLE XI: Immune-responsiveness of CD4 ⁺ T cells during <i>Streptococcus suis</i> serotype 2 infection.	clvii

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau I.	Nombre de cas de maladies invasives à GBS et de décès ainsi que l'incidence selon l'âge aux États-Unis (1999-2005).	9
Tableau II.	Signes cliniques chez les adultes infectés par GBS.	13
Tableau III.	Récepteurs impliqués dans la phagocytose.	54
Tableau IV.	Résumé des mécanismes exploités chez les bactéries pour leur internalisation	61
Tableau V.	TLRs reconnaissent divers motifs moléculaires associés aux pathogènes dont les bactéries, les champignons, les protozoaires et les virus.	65
Tableau VI.	PAMPs et DAMPs détectées par les NLRs.....	70
Tableau VII.	Spécialisation des différentes cellules présentatrices d'antigènes (APCs).....	77
Tableau VIII.	Principaux types de DCs chez la souris dans les organes lymphoïdes	82
Tableau IX.	Distribution dans les organes chez la souris de certaines sous-populations de cellules dendritiques (DCs)	83

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

ARTICLE I: Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells.

Supplemental Table I.	Bacterial strains, plasmids and oligonucleotide primers used in this study.	140
-----------------------	--	-----

ARTICLE II: Encapsulated Group B *Streptococcus* modulates dendritic cell functions via lipid rafts and clathrin-mediated endocytosis.

Table I. Inhibitors of endocytosis.....150

ARTICLE V: Implication of TLR- but not NOD2-signalling pathways are involved in dendritic cell activation by Group B *Streptococcus* serotypes III and V

Table I. Bacterial strains, plasmids and oligonucleotide primers used in this study201

ARTICLE VI: Differential modulation of natural killer cell functions during the innate immune response to pathogenic streptococci.

Table 1. Bacterial strains, plasmids used in this study.....228

ANNEXES

ARTICLE VII : Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells

Table I. Bacterial Strains and Plasmids.....xxxvii

ARTICLE VIII : Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* capsular polysaccharides induce chemokine production by dendritic cells via Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent and -independent pathways.

Table I. Quality control tests of purified *S. suis* and GBS CPSs.Ixxvii

Supplemental Table I. Sequences of murine-specific real-time PCR primers.Ixxxii

ARTICLE IX : Exacerbated type II interferon response drives hypervirulence and toxic shock by an emergent epidemic strain of *Streptococcus suis*.

Table I.	Validation of microarray gene expression using real-time RT-qPCR in C57BL/6 mice infected with different <i>S. suis</i> strains for 6 h	cxii
Supplemental Table I.	Primer sequences used for real-time RT-qPCR.....	cxiii
Supplemental Table II.	Genes up-regulated greater than three-fold in C57BL/6 mice infected with different <i>S. suis</i> strains (intermediate pathogenic North American, high pathogenic European, or epidemic Chinese) for 3 h.....	cxiv
Supplemental Table III.	Genes down-regulated greater than three-fold in C57BL/6 mice infected with different <i>S. suis</i> strains (intermediate pathogenic North American, high pathogenic European, or epidemic Chinese) for 3 h.....	cxvii
Supplemental Table IV.	Genes up-regulated greater than three-fold in C57BL/6 mice infected with intermediate pathogenic North American, high pathogenic European, or epidemic Chinese strain of <i>S. suis</i> for 6 h.	cxviii
Supplemental Table V.	Genes down-regulated greater than three-fold in C57BL/6 mice infected with intermediate pathogenic North American, high pathogenic European, or epidemic Chinese strain of <i>S. suis</i> for 6 h	cxxvi

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1.	Image du GBS de type III par microscopie électronique.....	14
Figure 2.	Schéma des facteurs de virulence de GBS impliqués dans l'adhésion, l'invasion et l'échappement à l'élimination par le système immunitaire inné	15
Figure 3.	Locus <i>cps</i> de GBS de type III.....	16
Figure 4.	Schéma du locus de la capsule polysaccharidique des sérotypes de GBS.....	17
Figure 5.	Mécanismes d'adhésion cellulaire et d'invasion de GBS chez l'hôte.....	24
Figure 6.	Mécanismes de résistance immunitaire face à GBS.....	27
Figure 7.	Image de <i>S. suis</i> de type 2 par microscopie électronique	35
Figure 8.	Version modifiée du <i>locus cps</i> de <i>S. suis</i> de type 2	37
Figure 9.	Mécanismes d'adhésion et d'invasion cellulaire utilisés par <i>S. suis</i>	42
Figure 10.	Résistance de <i>S. suis</i> à l'immunité innée.....	44
Figure 11.	Invasion du système nerveux central par <i>S. suis</i>	48
Figure 12.	Réponse immunitaire innée lors d'invasion par des bactéries pathogènes	50
Figure 13.	Voies d'internalisation dans les cellules	52
Figure 14.	Aperçu des principaux événements de l'endocytose dépendante de la clathrine	56

Figure 15. Voie d'endocytose dépendante des cavéoles.....	57
Figure 16. Représentation schématique des radeaux lipidiques.....	58
Figure 17. Représentation schématique des voies d'endocytose qui ont lieu dans les domaines de radeaux lipidiques de la membrane cellulaire et certains de leurs régulateurs clés.....	59
Figure 18. Récepteurs de type Toll et leurs voies de signalisation	64
Figure 19. Schéma des voies de signalisation entre TLR2 et divers récepteurs	67
Figure 20. Vue d'ensemble des principales voies de signalisation des TLRs	67
Figure 21. Image par microscopie électronique à balayage de DCs dérivées de la moelle osseuse.....	76
Figure 22. Modèle théorique de l'origine du développement des DCs chez la souris.....	80
Figure 23. Distribution des sous-populations de DCs majeures dans le sang, les tissus épithéliaux et les ganglions lymphatiques chez l'humain	85
Figure 24. Traitement et la présentation des molécules du CMH par les DCs	89
Figure 25. Exemple d'interactions entre les DCs matures et les lymphocytes T CD4+.	90
Figure 26. Image par microscopie électronique à balayage d'une cellule NK détruisant une cellule cancéreuse.....	92
Figure 27. Cycle dynamique de la vie des cellules NK.....	94
Figure 28. Version modifiée des principales sous-populations de cellules NK décrites chez l'humain et chez la souris.....	98

Figure 29. Principaux récepteurs impliqués dans les interactions entre les DCs et les cellules NK.	106
Figure 30. Vue d'ensemble schématique de l'activation des cellules NK médiée par les DCs ainsi que la survie/prolifération des cellules NK.	107
Figure 31. Aperçu schématique de la maturation des DCs par les cellules NK.	108

MATERIELS ET MÉTHODES

ARTICLE I: Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells.

Figure 1. GBS phagocytosis by and intracellular survival within DCs: role of bacterial capsular polysaccharide	127
Figure 2. Confocal laser scanning microscopy of GBS internalization by DCs	127
Figure 3. Electron microscopy studies of GBS interactions with DCs	128
Figure 4. GBS induces DC surface expression of co-stimulatory molecules and cytokine release.	131
Figure 5. Encapsulated GBS modulates cytokine production by primary spleen DCs	132
Figure 6. Effect of bacterial phagocytosis on cytokine production by GBS-stimulated DCs.	134
Supplemental Figure 1. Phenotypic characterization of the GBS mutant strain	119
Supplemental Figure 2. Cell culture quality controls	122
Supplemental Figure 3. Blockade of actin filaments confirms GBS internalization by DCs	128

ARTICLE II: Encapsulated Group B *Streptococcus* modulates dendritic cell functions via lipid rafts and clathrin-mediated endocytosis.

Figure 1.	Role of clathrin-mediated endocytosis in GBS internalization by DCs	155
Figure 2.	Role of lipid rafts and caveolae/caveolin-1 in GBS internalization by DCs	157
Figure 3.	Role of caveolin-1 in GBS modulation of DC activation	160
Supplemental Figure 1.	Phagocytosis of latex beads is not affected by clathrin inhibitors	154

ARTICLE III: The NOD2 receptor does not play a major role in the pathogenesis of Group B *Streptococcus* in mice

Figure 1.	Absence of NOD2 receptor does not alter mouse susceptibility to GBS infection.....	176
Figure 2.	<i>Ex-vivo</i> production of pro-inflammatory cytokines and chemokines is reduced in NOD2 ^{-/-} mice infected with GBS.	178
Figure 3.	Serum pro-inflammatory cytokine production is reduced in NOD2 ^{-/-} mice infected with GBS.....	179
Figure 4.	CD69 expression by T and B cells is not significantly altered in GBS-infected NOD2 ^{-/-} mice.	180

ARTICLE V: Implication of TLR- but not NOD2-signalling pathways are involved in dendritic cell activation by Group B *Streptococcus* serotypes III and V

Figure 1.	Phagocytosis by and intracellular survival within DCs of type V GBS: role of bacterial capsular polysaccharide.	206
Figure 2.	Effect of MyD88, TLR2 or NOD2 deficiency on the capacity of DCs to internalize GBS.	208

Figure 3.	Impact of MyD88 on cytokine release by DCs in response to GBS.	209
Figure 4.	Effect of TLR2 on cytokine release by DCs in response to GBS.	211
Figure 5.	Effect of NOD2 on cytokine release by DCs in response to GBS.	213
Supplemental Figure 1.	Cytokine response of knock-out cells using specific TLR-ligands	204

ARTICLE VI: Differential modulation of natural killer cell functions during the innate immune response to pathogenic streptococci.

Figure 1.	<i>Ex vivo</i> analyses of cellular sources of IFN- γ during the acute phase of streptococcal infections.	234
Figure 2.	TNF- α production and CD69 expression by NK1.1+ cells during the acute phase of streptococcal infections.	236
Figure 3.	NK1.1+ population decrease after GBS or <i>S. suis</i> infection.	238
Figure 4.	Cytokine profiles of DC-NK cell co-cultures in contact with GBS or <i>S. suis</i>	239
Figure 5.	Different mechanisms mediate DC-NK cell crosstalk during GBS or <i>S. suis</i> infections.	242
Figure 6.	Role of bacterial capsular polysaccharide in the modulation of cytokine production by NK cells.	244
Supplemental Figure 1.	Purity levels of culture-expanded natural killer (NK) cells.	229
Supplemental Figure 2.	Determination of optimal DC: NK ratio for co-cultures.	230

Supplemental Figure 3. Effect of bacterial CPS on cytokine release by DCs in response to <i>S. suis</i>	245
---	-----

DISCUSSION

Figure 32. GBS réside dans des compartiments acidifiés et non-acidifiés à l'intérieur des DCs.	263
Figure 33. L'importance de GBC dans la production de cytokines par les DCs en contact avec GBS.	283
Figure 34. Modèle proposé des interactions entre GBS de type III et les DCs.	284
Figure 35. Modèle proposé des interactions entre <i>S. suis</i> de type 2 et les DCs	286
Figure 36. Modèle proposé de l'importance des DCs dans l'activation des cellules NK ainsi que dans la réponse innée suite à une infection par des streptocoques encapsulées	289

ANNEXES

ARTICLE VII :Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells

Figure 1. Growth curves of <i>S. suis</i> strains and effect of complement deposition.....	xl
Figure 2. Internalization of <i>Streptococcus suis</i> in DCs.	xlii
Figure 3. Cytokine production by bone marrow-derived DCs in response to stimulation by <i>S. suis</i> strains.	xliv
Figure 4. Effect of serum on interleukin IL-12p70 and IL-10 production by bone marrow-derived DCs.....	xlvi

Figure 5.	Expression of surface markers by bone marrow–derived DCs stimulated with <i>S. suis</i>	xlvi
-----------	---	------

Figure 6.	Proposed model of interactions between DCs and <i>Streptococcus suis</i>	l
-----------	--	---

ARTICLE VIII : Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* capsular polysaccharides induce chemokine production by dendritic cells via Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent and -independent pathways.

Figure 1.	Recognition of <i>S. suis</i> and GBS CPSs by dot-ELISA.....	lxviii
-----------	--	--------

Figure 2.	Recognition of <i>S. suis</i> and GBS CPSs by ELLA	lxix
-----------	--	------

Figure 3.	Pro- and anti-inflammatory cytokine production by DCs in response to stimulation by <i>S. suis</i> or GBS CPSs for 24 h.	lxx
-----------	---	-----

Figure 4.	Chemokine production by DCs in response to stimulation by <i>S. suis</i> or GBS CPSs for 24 h	lxxi
-----------	---	------

Figure 5.	CCL2 production by DCs in response to stimulation by <i>S. suis</i> type 2 CPS is dose and time dependent.	lxxi
-----------	---	------

Figure 6.	Role of TLR2 in chemokine production by DCs in response to stimulation by <i>S. suis</i> or GBS CPSs for 24 h	lxxii
-----------	---	-------

Figure 7.	Role of MyD88 in chemokine production by DCs in response to stimulation by <i>S. suis</i> or GBS CPSs for 24 h.....	lxxiii
-----------	---	--------

Figure 8.	Relative expression of BAFF mRNA by DCs in response to stimulation by <i>S. suis</i> or GBS CPSs for 24 h	lxxiv
-----------	---	-------

Figure 9.	Effect of pre-incubation of DCs with <i>S. suis</i> or GBS CPSs on IFN- γ -induced expression of BAFF mRNA	lxxv
-----------	---	------

Supplemental Figure 1.	Nuclear magnetic resonance spectra of native and desialylated <i>S. suis</i> capsular polysaccharides.	lxxxi
------------------------	---	-------

Supplemental Figure 2.	Nuclear magnetic resonance spectra of native and desialylated GBS capsular polysaccharides.	lxxxii
------------------------	--	--------

ARTICLE IX : Exacerbated type II interferon response drives hypervirulence and toxic shock by an emergent epidemic strain of *Streptococcus suis*.

Figure 1.	<i>S. suis</i> MLST.....	xcii
Figure 2.	The <i>S. suis</i> epidemic Chinese strain is more virulent than the highly pathogenic European strain and the intermediately pathogenic.	xcix
Figure 3.	Host genes are modified in greater numbers in C57BL/6 mice infected with the epidemic Chinese strain of <i>S. suis</i> than mice infected with either the highly pathogenic European or intermediately pathogenic North American strains.....	ci
Figure 4.	Proinflammatory cytokines and chemokines are highly expressed in mice infected with the epidemic Chinese strain of <i>S. suis</i>	cii
Figure 5.	Type I and II IFN pathways are differently expressed in C57BL/6 mice infected with the intermediately pathogenic North American, the highly pathogenic European, or the Chinese epidemic strain of <i>S. suis</i>	cv
Figure 6.	IFN- γ exacerbates the host response following an infection by the epidemic Chinese strain of <i>S. suis</i> : role of NK cells.	cvii
Supplemental Figure 1.	Growth curves of the intermediately pathogenic North American, the highly pathogenic European, and the epidemic Chinese strains of <i>S. suis</i>	cxxvii

ARTICLE X: Group B *Streptococcus* induces a robust IFN- γ response by CD4⁺ T cells in an *in vitro* and *in vivo* model.

Figure 1.	Survival curves and bacteremia levels of GBS-infected C57BL/6 mice....	cxlii
-----------	--	-------

Figure 2.	<i>Ex vivo</i> cytokine and chemokine production profile by total splenocytes. cxliv
Figure 3.	<i>Ex vivo</i> analyses of cellular sources of IFN- γ during GBS infection cxlv
Figure 4.	<i>Ex vivo</i> analyses of CD4 ⁺ T cell contribution to cytokine productioncxlvi
Figure 5.	<i>In vivo</i> CD4 ⁺ T cell contribution to cytokine production during primary and secondary GBS infectionscxlvii
Figure 6.	Role of bacterial capsular polysaccharide in the modulation of cytokine production by CD4 ⁺ T cells cxlviii
Figure 7.	Role of bacterial capsular polysaccharide in the modulation of CD4 ⁺ T cell surface expression of CD69 cl

ARTICLE XI : Immune-responsiveness of CD4⁺ T cells during *Streptococcus suis* serotype 2 infection.

Figure 1.	<i>Ex vivo</i> cytokine and chemokine production profiles by total splenocytes in response to <i>S. suis</i> clxx
Figure 2.	<i>Ex vivo</i> analyses of cellular sources of IFN- γ and CD3 ⁺ T cell activation during <i>S. suis</i> infection.clxxi
Figure 3.	<i>Ex vivo</i> analyses of CD4 ⁺ T cell contribution to cytokine production.clxxii
Figure 4.	<i>In vivo</i> CD4 ⁺ T cell contribution to cytokine production during primary and secondary <i>S. suis</i> infections. clxxiii
Figure 5.	Numbers of splenic CD4 ⁺ T cells during <i>S. suis</i> primary infection.....clxxiv
Figure 6.	Role of bacterial capsular polysaccharide in the modulation of cytokine production by CD4 ⁺ T cellsclxxv
Figure 7.	Role of bacterial capsular polysaccharide in the modulation of CD4 ⁺ T cell surface expression of CD69 and CD40L clxxvii

Figure 8.	Serum levels of <i>S. suis</i> specific antibodies in infected animals.....	clxxviii
Figure 9.	Effect of <i>S. suis</i> on the production of ovalbumin (OVA)-specific antibodies	clxxix
Figure 10.	Correlation between serum levels of OVA-specific antibodies and clinical signs developed by <i>S. suis</i> -infected mice	clxxx

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

β-H/C	β -hémolysine/cytolysine
Ab	anticorps
ACP	protéine C α
AMP	peptide antimicrobien
APC	cellule présentatrice d'antigène
ADCC	cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
BCR	récepteur des cellules B
BCP	protéine C β
BHE	barrière hémato-encéphalique
BibA	adhésine bactérienne immunogénique de GBS
BIR	'baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat'
bmDC	cellule dendritique dérivée de la moelle osseuse
BMEC	cellule endothéliale microvascularisée spécialisée du cerveau
CARD	'caspase-activation and recruitment domain'
CAV	cavéoline
CIITA	'MHC class II transcription activator'
CCL	'chemokine ligand'
CCP	'clathrin-coated pits'
CCV	'clathrin-coated vesicles'
CLP	simple précurseur lymphoïde
CMP	simple précurseur myéloïde
CLR	récepteur classique de lectines de type C
CME	endocytose médiée par la clathrine
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CPS	capsule polysaccharidique
CPEC	cellule épithéliale du plexus choroïde
CR	récepteur du complément
CRR	'CC chemokine receptor'
CXCL	'chemokine CXC motif ligand'
CXCR	'CXC chemokine receptor'
Cyst	cystatine
DAMPs	motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires

D-Ala	D-Alanine
DC	cellule dendritique
DppIV	dipeptidyl peptidase IV
ECM	matrice extracellulaire
EOD	'early onset disease'
Erk	'extracellular signal-regulated kinases'
FbsA/B	protéine de liaison au fibrinogène A et B
Fbps	protéine de liaison à la fibronectine
GADPH	'glyceraldehyde-3-phosphatase deshydrogenase'
Gal	galactose
GBC	antigène du groupe B
GBS	<i>Streptococcus</i> du Groupe B
Glc	glucose
GlcNAc	N-Acétylglucosamine
GM-CSF	'granulocyte-macrophage colony-stimulating factor'
GPI-AP	'glycosylphosphatidyl-inositol anchored proteins'
Gram +	Gram positif
Gram -	Gram negative
GTPases	'guanosine triphosphatases'
Hémato-CSF	barrière séparant le liquide céphalo-rachidien du sang
HET-E	'incompatibility locus protein from <i>Podospora anserine</i> '
HL	Hyaluronate lyase
HSC	cellules souches hématopoïétique CD34
iC3b	C3b inactif
iNOS	synthase inductible de l'oxyde nitrique
IFN	interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
JNK	'c-Jun N-terminal kinase'
KIR	killer-cell immunoglobulin-like receptor
LC	'Langerhans cells'
Lmb	'laminin-binding protein'
LOD	'late onset disease'
LPS	lipopolysaccharide

LRR	‘leucine-rich repeat’
LTA	acide lipotéichoïque
MAC	complexe d’attaque membranaire
MAPK	‘mitogen-activated protein kinase’
MDP	muramyl dipeptide
MLST	‘multilocus sequence typing’
MR	récepteur mannose
MyD88	‘myeloid differentiation primary response 88’
NAIP	‘neuronal apoptosis inhibitory protein’
NATCH	‘central nucleotide-binding domain’
NCR	‘natural cytotoxicity receptor’
NETs	‘neutrophil extracellular traps’
NF-κB	facteur nucléaire κ B
NK	‘natural killer’
NKT	‘natural killer’ T
NLR	‘NOD-like receptor’
NLRC4	‘NLR family, CARD domain-containing 4’
NLRP	‘NLR family, pyrin domain-containing’
NO	oxyde nitrique
NOD	‘nucleotide-binding and oligomerization domain’
PAMP	motifs moléculaires associés aux pathogènes
PBP	‘penicillin-binding protein’
PBMC	cellules mononucléaires périphérique du sang
pDC	DC plasmacytoïde
PGN	peptidoglycane
PI3K	‘phosphoinositide 3-kinase’
PRR	récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
PRU	unités répétitives de polysaccharides
PS	polysaccharide
PCR	réaction en chaîne de la polymérase
PCV	circovirus porcin
PRRS	‘porcine reproductive and respiratory syndrome’
PYD	‘pyrin domain’
Rha	rhamnose

ROS	dérivés réactifs de l'oxygène
Scpb	'C5a-peptidase b'
Siglecs	'sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins'
Sod	superoxyde dismutase
SII	système immunitaire innée
SLY	suilysine
SNC	système nerveux central
Srr1	'serine-rich repeat domain protein 1'
SR	'scavenger receptor'
SspA	'surface-associated subtilisin-like protease'
STSLs	'streptococcal toxic shock-like syndrome'
TCR	récepteur des cellules T
Th	T auxiliaire ou 'helper'
TIR	'Toll/interleukin-1 receptor'
TLR	récepteur de type Toll
TNF	'tumor necrosis factor'
TP1	'telomerase-associated protein'
Treg	cellule T régulatrice
TRIF	'TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β '
WT	'wild-type' ou souche-mère

À mon père

REMERCIEMENTS

“Le succès n’est pas la clé du bonheur. Le bonheur, est la clé du succès.

Si vous aimez ce que vous faites, vous réussirez.”

- Albert Schweitzer

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice, Dre Mariela Segura. Mariela, merci pour votre présence, vos conseils, votre confiance et votre dévouement. Je tiens à vous remercier pour tout le temps consacré à mon projet de recherche, d'avoir reconnu mes forces et accepté mes mauvais plis. Ce fut un privilège d'être votre 'premier' étudiant et une expérience très enrichissante de démarrer un nouveau laboratoire à vos côtés. Il me reste beaucoup à apprendre du milieu de la recherche, mais vous avez réussi à me transmettre de bons outils qui me permettront de faire mon propre chemin. Vous êtes une directrice hors pair, continuez de garder cette belle approche envers vos étudiants.

Je tiens à souligner et à remercier l'appui du Dr Gottschalk tout au long de mon doctorat. Vous m'avez ouvert les portes de votre laboratoire au début de mon projet quand nous n'avions pas notre propre laboratoire. Vos conseils au fil des années m'ont toujours inspiré à donner le meilleur de moi-même. Merci de m'avoir permis de créer des liens avec vos étudiants et de m'avoir laissé l'opportunité de faire mes marques.

À tous les membres de mes comités et jurys au fil des années : Dr Jean-Pierre Lavoie, Dr Marcelo Gottschalk, Dre Marie Archambault, Dre Fatiha Chandad, Dre Tatiana Scorza et Dre Lucie Lamontagne, je vous remercie pour tout le temps que vous avez accordé à mon projet ainsi que vos précieux conseils.

Je tiens à remercier Sonia Lacouture, assistante de recherche du laboratoire au Dr Gottschalk. Apprendre à gérer un laboratoire relève du défi et sa présence et ses conseils m'ont beaucoup aidé à organiser le laboratoire de la Dre Mariela Segura. Je vais toujours me souvenir de nos fous rires et de nos moments à parler de science mais aussi de la vie.

Étudier au doctorat, ce n'est pas seulement faire de la recherche, mais c'est aussi créer de forts liens d'amitié. Merci à tous mes collègues, anciens et présents, avec qui j'ai

eu la chance de collaborer et de créer des liens au fil des années. Marycruz, Nahuel et Claude, je vous admire pour vos parcours de vie et vous êtes pour moi une grande source d'inspiration. Merci beaucoup à Marie-Pier pour son aide au début de mon doctorat. Aux plus jeunes, Guillaume, Jean-Philippe, Corinne et David, vous avez fait sortir en moi mon côté 'grand frère' et je vous souhaite le meilleur pour votre futur. Mon passage dans le monde des cycles supérieurs n'aurait pas été le même sans la présence de Cynthia, une amie extraordinaire avec qui j'ai pu partager les bons moments et les moments les plus difficiles au doctorat. Merci beaucoup Cynthia.

À ma famille, mes amis ... votre soutien m'a beaucoup aidé au fil des années. Monique, merci d'être une mère exceptionnelle, merci pour ton amour inconditionnel. Isabelle, Éric et Julie, merci pour votre patience et votre support. À mon père, Alain, merci d'avoir cru en moi. Tous les efforts que j'ai mis dans mes études, ce fut avant tout pour moi mais aussi pour toi. À ta façon, tu as réussi à faire de moi une meilleure personne. Geneviève, tu m'as toujours soutenu et encouragé. Tu as été la main sur l'épaule durant mes études mais aussi dans ma vie. Je t'en serai éternellement reconnaissant.

J'aimerais aussi remercier les membres du GREMIP et du CRIPA ainsi que la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Certains diront qu'étudier à St-Hyacinthe est une torture mais pour ma part, l'expérience a été des plus enrichissantes. Vous avez fait de mon doctorat une des plus belles expériences de ma vie. Le déroulement de mes études n'auraient pas le même sans l'aide précieuse et chaleureuse de Diane Rodier, Christine Blondin, Micheline St-Germain, Nancy Bisailon, Hélène Boucher-Rhéaume, Manon Coutellier et Isabelle Flibotte lors de mes dix milles questions d'ordre administratif. Merci à Claudia Duquette pour ton aide au labo et pour nos fous rires. Merci aussi particulièrement à Normand Lacasse et Marina Poulin ainsi qu'au comité éthique de l'université dont la collaboration précieuse a permis de vivre une expérimentation animale dans une atmosphère respectueuse. Travailler avec un modèle animal en recherche est un privilège et j'en suis très redevant.

Finalement, un très grand merci aux organismes subventionnaires pour le soutien financier : les Fonds québécois de la recherche sur la nature et la technologie (FQRNT), le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), la Faculté de médecine vétérinaire, le CRIPA et la Faculté des études supérieures et postdoctorales.

I – INTRODUCTION

Les infections invasives graves causées par les bactéries encapsulées sont un sérieux problème à travers le monde en médecine vétérinaire et humaine. *Streptococcus* du Groupe B (GBS) et *Streptococcus suis* sont deux bactéries encapsulées qui provoquent des pathologies similaires, y compris la méningite et la septicémie chez les animaux et/ou les humains. Plus particulièrement, les maladies causées par GBS touchent les nouveaux-nés et les nourrissons, mais GBS est également reconnu comme une cause émergente d'infections invasives potentiellement mortelles chez les adultes plus âgés et les patients immunosupprimés (1). Les stratégies nationales mises en place ont permis de réduire l'incidence des infections néonatales à GBS, mais n'ont eu aucun impact majeur sur l'incidence chez les jeunes enfants. De plus, l'implantation de telles mesures reste plutôt difficile dans les pays en voie de développement, en particulier en Afrique (1). *S. suis* constitue l'un des pathogènes majeurs chez le porc qui génère des pertes économiques importantes dans l'industrie porcine au Canada (2). Il est aussi un agent zoonotique en émergence chez les humains, en particulier dans les pays asiatiques (2, 3). En effet, *S. suis* est reconnu maintenant comme la principale cause de méningite adulte au Vietnam, la deuxième en Thaïlande et la troisième à Hong Kong (4). Finalement, les deux épidémies humaines de 'streptococcal toxic shock-like syndrome' (STSLs) dues à *S. suis* en Chine au cours des dernières années ont causé des taux de mortalité de près de 20% et placent *S. suis* comme une source de préoccupation en santé publique (2).

Comme mentionné précédemment, GBS et *S. suis* sont deux bactéries encapsulées qui possèdent une capsule polysaccharidique (CPS) à leur surface. La CPS est considérée comme l'un des facteurs de virulence les plus importants dans la pathogenèse de l'infection de ces pathogènes (3, 5). Cette CPS couvre les protéines antigéniques présentes à la surface bactérienne et empêche le déclenchement d'une réponse immunitaire protectrice, ce qui permet l'évasion bactérienne chez l'hôte. La CPS est également à la base du sérotypage chez GBS et *S. suis*. Parmi les 10 sérotypes de GBS qui ont été caractérisés, GBS de type III est parmi les plus communs dans la méningite néonatale, tandis que GBS de type V est reconnu comme une des principales causes de maladies invasives chez les adultes (1, 6, 7). La structure de la plupart des CPSs de GBS est connue et formée par différents arrangements de monosaccharides (8). Chez *S. suis*, parmi les 35 sérotypes, le type 2 est le plus virulent chez le porc et l'humain et la plupart des études ont été réalisées avec ce sérotype (2, 3, 9). Le type 14 de *S. suis* émerge également comme un pathogène zoonotique (10). Sauf pour les types 2 et 14, la structure des CPSs de différents sérotypes

de *S. suis* n'est pas encore connue jusqu'à ce jour. GBS (tous les sérotypes) et *S. suis* (types 2 et 14) partagent la caractéristique particulière d'être les seules bactéries à Gram positif (Gram +) qui possèdent l'acide sialique dans leurs CPSs. Fait intéressant, les cellules chez les mammifères possèdent également l'acide sialique à leur surface et il est impliqué dans la modulation de la réponse immunitaire (11). Il a été suggéré que l'acide sialique sur les CPSs de bactéries pathogènes pourrait être impliqué dans l'évasion immunitaire en mimant les épitopes du soi de l'hôte. La structure et/ou la composition biochimique de la CPS joueraient ainsi un rôle important dans cette évasion (12-14). Dans cette optique, le lien de l'acide sialique avec le sucre adjacent est différent entre GBS et *S. suis* (8, 15-17), ce qui laisse suggérer que les CPSs des deux bactéries régulent différemment la réponse immune (13). De plus, une étude précédente a suggéré que GBS de type III et *S. suis* de type 2 interagissent différemment avec les macrophages murins et les CPSs de ces deux pathogènes auraient un rôle différent dans ces interactions (18).

Depuis plus d'une décennie, beaucoup de recherches ont apporté une lumière sur les interactions entre GBS ou *S. suis* avec des phagocytes professionnels tels que les macrophages et les neutrophiles (3, 5). Cependant, les stratégies utilisées par GBS ou *S. suis* pour manipuler les fonctions des cellules dendritiques (DC), reconnues comme les cellules présentatrices d'antigène (APC) les plus puissantes, n'ont pas été étudiées ainsi que les conséquences sous-jacentes à leur maturation et leur activation. Les études disponibles sur les interactions entre les DCs et les streptocoques étaient principalement réalisées avec *Streptococcus pneumoniae* où il a été démontré que ce pathogène interagit avec les DCs (19-22). Par exemple, *S. pneumoniae* induit l'apoptose chez les DCs humaines et murines et la présence de la pneumolysine interfère dans la maturation et la production de cytokines par les DCs (19). Chez la souris, la présence de la CPS affecte la phagocytose de *S. pneumoniae* par les DCs, mais intervient partiellement dans la production de cytokines chez ce type cellulaire (20). Les DCs ont une importance cruciale dans l'immunité et elles initient la réponse immunitaire innée contre les pathogènes. Les DCs sont considérées comme un lien essentiel entre les immunités innées et adaptatives (23). De plus, elles jouent un rôle important dans l'activation de lymphocytes tels que les cellules 'natural killer' (NK), des cellules clés dans la régulation de la réponse immunitaire innée. Plusieurs études ont démontré l'importance des interactions entre les DCs et les cellules NK dans diverses situations telles qu'en présence de cellules tumorales, d'infections virales ou bactériennes (24-26). Au début de ce projet de thèse, aucune donnée n'était

disponible sur le niveau d'activation des cellules NK durant une infection à GBS ou à *S. suis*.

Basée sur ces observations, notre hypothèse est que GBS et *S. suis* activent les fonctions des DCs et des cellules NK et, par extension, ces cellules contribuent à la modulation des réponses immunitaires innées et adaptatives. Nous suggérons également l'hypothèse que les CPSs de GBS et de *S. suis* affectent différemment l'activation des DCs.

♦ L'objectif général de cette thèse est de caractériser les interactions entre GBS ou *S. suis* avec les DCs et les cellules NK, ainsi que d'évaluer l'impact de la CPS dans ces interactions.

♦ Les **objectifs spécifiques** de ce projet sont :

1. Étudier les interactions entre GBS ou *S. suis* et les DCs en utilisant un modèle de culture *in vitro*.

- Cet objectif se concentrera sur la capacité d'internalisation des DCs et leur capacité bactéricide face à ces streptocoques, les mécanismes d'internalisation utilisés si tel est le cas, ainsi que la production de cytokines et l'expression de molécules de co-stimulation. L'implication des récepteurs extracellulaires et intracellulaires sera également étudiée.

2. Caractériser le rôle des cellules NK dans la réponse innée face à GBS ou à *S. suis* grâce à un modèle d'infection *in vivo* et *ex vivo*.

- Cet objectif se concentrera sur l'importance des cellules NK par des analyses multiparamétriques de cellules provenant de rates de souris infectées et également sur l'activation des cellules NK *in vitro* et l'importance des DCs dans cette activation.

3. Évaluer l'impact de la capsule polysaccharidique (CPS) dans l'immunité innée face à GBS ou à *S. suis*.

- Cet objectif se concentra sur les différences entre les souches encapsulées de GBS ou de *S. suis* et leurs mutants non encapsulés respectifs dans les interactions *in vitro* avec les DCs et/ou les cellules NK.

À travers ce document, nous montrons pour la première fois la contribution des DCs et des cellules NK dans la réponse immunitaire innée lors d'une infection à GBS ou à *S. suis* et, par extension, dans le développement d'une réponse T auxiliaire de type 1 (T 'helper' en anglais; Th1). Ces résultats renforcent davantage le rôle central des DCs dans le contrôle efficace des infections causées par des bactéries encapsulées et peuvent fournir de nouvelles idées pour le développement de vaccins et l'implantation de meilleures stratégies thérapeutiques.

II – REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Aspects généraux de *Streptococcus* du Groupe B

1.1 Historique et épidémiologie

Streptococcus du Groupe B (GBS) ou *Streptococcus agalactiae* a été décrit, pour la première fois en 1887, lorsque Nocard et Mollereau l'ont décrit comme l'une des causes de la mammite bovine (27). Chez l'humain, les premières études relatant la présence de GBS remontent dans les années 1930 en Angleterre par Lancefield dans des cas de septicémies puerpérales où GBS a été identifié à partir de prélèvements vaginaux (1, 28). Depuis, il est principalement reconnu comme un pathogène humain (29).

Malgré des cas sporadiques de GBS durant des décennies, au début des années 1970, la mortalité néonatale liée aux maladies causées par GBS était aussi élevée que 55% (30). L'épidémiologie des maladies a depuis fortement changé au cours des années par l'implantation de mesures préventives et de thérapies antimicrobiennes. Malgré ces grands changements, GBS continue d'être l'une des causes principales de septicémie néonatale (1). La stratégie la plus efficace dont nous disposons actuellement pour la prévention chez le nouveau-né est le dépistage chez les femmes enceintes et l'accès à un traitement aux antibiotiques intrapartum (31). Par contre, dans certaines régions d'Afrique, GBS est en train de devenir l'une des causes les plus importantes de septicémie néonatale et de méningite avec une incidence globale aussi élevée que 1,8 cas pour 1000 naissances et un taux de mortalité jusqu'à 33% (32).

Contrairement à la tendance à la baisse chez les nouveaux-nés et les femmes enceintes, l'incidence de la maladie causée par GBS chez l'adulte, une autre population à risque, a augmenté de plus de 30 %. Cette incidence croissante de la maladie invasive chez les adultes pourrait être liée à l'augmentation de la prévalence de conditions médicales sous-jacentes comme le diabète ainsi que le vieillissement de la population (33). Aujourd'hui, les personnes âgées de plus de 65 ans représentent au-dessus de 40 % des sujets atteints de maladies causées par GBS et pour plus de 50% des décès associés à ce pathogène aux États-Unis (6, 34). Au Canada, peu d'informations et peu de données récentes documentent l'incidence ou les caractéristiques épidémiologiques et microbiologiques de maladies invasives à GBS. En 1996, le *Canadian Sentinel Health Unit Surveillance System* a effectué une étude sur les maladies causées par GBS au Canada

(35). Pendant cette période, le taux d'incidence annuel pour les adultes était de 4,1 pour 100 000 personnes. Le taux de létalité était de 5,5 % et était suffisamment important pour mettre en évidence l'utilité d'élaborer des stratégies pour prévenir les infections causées par GBS dans notre pays (35).

Le sérotypage de GBS, sur la base des différences antigéniques dans la capsule polysaccharidique (CPS), permet de le classer en dix sérotypes (Ia, Ib, II-IX) (36, 37). Les types les plus dominants sont le Ia (22,8%), le III (12,3%) et le V (47,3%) (6). De plus, les types Ia, II et III sont ceux les plus fréquemment identifiés chez les femmes enceintes (38). Le type III est celui le plus fréquemment isolé des cas de méningite (31). Quant au type V, il représente 30 à 45% des infections invasives et c'est le plus répandu chez les adultes et les personnes âgées bien avant les type Ia et III (35, 39). La prédominance des sérotypes varie aussi selon le pays et est en constante évolution et démontre, non seulement une variation régionale, mais aussi temporelle (36). Alors que les principaux types circulant aux États-Unis et en Europe (Ia, Ib, II, III et V) sont responsables de plus de 85% des infections causées par GBS, au Japon, plus de 40% des isolats sont de types VI et VIII (5). Concernant le type IX, aucune donnée n'est disponible sur sa prévalence. Au Canada, une récente étude à Toronto, suite à l'analyse de plusieurs isolats de GBS, démontre que les types Ia, III et V sont les plus prédominants (40) et que le type V est le plus associé aux maladies invasives à GBS chez les personnes de plus de 65 ans.

1.2 Maladies et manifestations cliniques

Dans les maladies infectieuses causées par GBS, de nombreux facteurs de risque sont présents. L'âge est une condition majeure de prédisposition. Le Tableau I (voir page suivante) montre l'incidence projetée de la maladie et de la mort associée à GBS par groupe d'âge aux États-Unis en 2005 (33). De plus, la prévalence est plus élevée chez les personnes sexuellement actives et ceux qui ont de multiples partenaires sexuels, ce qui suggère que l'acquisition de ce pathogène est causée par le contact intime. Ceci est également soutenu par une étude montrant des souches identiques dans 86% des partenaires sexuels co-colonisés (36). Cependant, les maladies causées par des infections à GBS ne sont pas considérées comme des maladies sexuellement transmissibles. D'autres facteurs peuvent aussi accroître le risque d'infections à GBS (31-33, 41).

Tableau I. Nombre de cas de maladies invasives à GBS et de décès ainsi que l'incidence selon l'âge aux États-Unis (1999-2005).

	Age Group					Total
	Birth-6 d	7- 89 d	1-14 y	15-64 y ^a	≥65 y	
Observed counts for surveillance areas, 1999-2005						
No. of cases	1232	1036	90	6496	5576	14573 ^b
No. of deaths ^c	83	48	11	472	730	1348 ^d
Estimated incidence and projected counts for United States, 2005 ^e						
Incidence	0.35	0.33	0.22	4.6	25.3	7.2
	/1000 births		/100 000 population			
No. of cases	1425	1375	124	9207	9308	21 439
No. of deaths ^c	63	46	8	557	1067	1741

Version adaptée de Phares *et al.* 2008 (33).

- a. Includes 409 pregnant women.
- b. Total number of cases includes 143 individuals aged 90 days to 12 months.
- c. Outcome was known for 99% of surveillance individuals younger than 1 year and 95% of those 1 year or older; thus the observed and projected number of deaths is a minimum and should not be used to generate direct estimates of case fatality rates.
- d. Total number of deaths includes 4 deaths among individuals aged 90 days to 12 months.
- e. Age- and race-specific incidence of disease was applied from the aggregate surveillance area to the age and racial distribution of the US populations or US live births as appropriate.

Abbreviations : d, days; y, years

Une infection à GBS peut provoquer diverses maladies, comme la bactériémie, la septicémie, la pneumonie avec détresse respiratoire ou une méningite avec des manifestations neurologiques. GBS est sensible à de nombreux antibiotiques, comme la pénicilline et l'ampicilline (les agents de première ligne pour la prophylaxie intrapartum). La survenue de la tolérance à la pénicilline dans des isolats cliniques de GBS varie selon les différentes études, allant de 5 à 15%. Il est également sensible à d'autres antibiotiques dont la ceftriaxone et la vancomycine (35, 42), malgré que 32% des isolats ont été rapportés pour être résistants à l'érythromycine et la clindamycine (33). Bien souvent, la pénicilline par voie

intraveineuse est le premier choix pour traiter une maladie aiguë et par la suite, le traitement peut être poursuivi par voie orale.

Pour faciliter la description des maladies causées par GBS, les manifestations cliniques seront abordées par groupes d'âge.

1.2.1 Femmes enceintes

GBS est une bactérie pouvant se retrouver dans les voies gastro-intestinales et génito-urinaires de la femme. La grossesse amène des modifications dans l'activation de l'immunité maternelle pour permettre au fœtus de bien s'implanter et de se développer à terme (appelées tolérance materno-fœtale). Malgré cela, le système immunitaire des femmes enceintes est apte à identifier et à répondre à de potentiels microorganismes envahisseurs. Cependant, plusieurs bactéries à Gram positif (Gram +) arrivent à échapper au système immunitaire maternel dont *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* et GBS (43). Environ 15 à 45 % des femmes enceintes sont colonisées par GBS (de façon temporaire, transitoire ou permanente au cours de la grossesse) et sont généralement asymptomatiques (31). L'immunosuppression du système immunitaire chez la femme enceinte pourrait expliquer pourquoi des femmes colonisées par GBS peuvent développer des maladies invasives causées par GBS lors de la grossesse. Les femmes colonisées ont un risque 25 fois plus élevé d'accoucher d'un bébé infecté à GBS par rapport aux femmes non-colonisées (38). Une infection à GBS chez la femme enceinte peut aller de l'infection légère des voies urinaires à une septicémie ou méningite mortelle. L'infection des voies urinaires est fréquente pendant la grossesse et dans le cas de GBS, l'infection se complique jusqu'à 7% des cas (29). La maladie chez les femmes enceintes et en postpartum est définie invasive quand GBS est isolé à partir d'un site normalement stérile, principalement dans le sang ou dans le liquide céphalo-rachidien. Lors d'une infection puerpérale, la bactériémie a lieu dans environ 35% des cas et progresse vers une septicémie dans moins de 25% des cas, tandis que le choc septique reste rare. Dans les pays en voie de développement, l'infection puerpérale est l'un des principaux facteurs responsables de la mortalité maternelle. Néanmoins, l'incidence de la mort par septicémie est faible comparativement à celle chez les adultes (29). D'autres infections à GBS comme l'endométrite, l'infection de plaies, l'ostéomyélite, l'endocardite, la cystite et la pyélonéphrite ont également été décrites (1, 29).

1.2.2 Nouveaux-nés et enfants

Dans les pays développés, GBS est l'un des agents pathogènes reliés aux infections bactériennes graves chez les nouveaux-nés et les jeunes enfants (1). L'infection néonatale avec ce pathogène opportuniste vient sous deux formes : infection dite 'early onset disease' (EOD) ou infection dite 'late onset disease' (LOD). La EOD regroupe les enfants jusqu'à 7 jours d'âge, mais la plupart des cas se retrouvent dans les 24 premières heures suivant la naissance. Les nouveaux-nés sont les plus souvent infectés lors de leur passage dans le canal génital en raison de la présence de bactéries dans le vagin de la mère. Contrairement à la EOD, la LOD peut se produire chez les nourrissons jusqu'à environ 7 mois d'âge (souvent à 3 ou 4 semaines d'âge). De plus, 75% des cas d'infections néonatales à GBS sont des EODs (31).

La EOD peut toucher les poumons, le cerveau et la moelle épinière du bébé et occasionner un pronostic fatal. C'est ce type d'infections que vise le traitement en prophylaxie à l'aide d'antibiotiques pour prévenir une transmission de GBS lors de l'accouchement. La transmission dans ce cas-ci est dite verticale (31), puisque le nouveau-né peut entrer en contact avec GBS lors de sa naissance par la voie maternelle naturelle, par l'aspiration de sécrétions vaginales infectées lors de l'accouchement ou lors de la rupture des membranes amniotiques. Suite à l'infection, le nouveau-né peut développer une pneumonie avec détresse respiratoire ou avec apnée qui, rapidement, peut évoluer vers une bactériémie et un choc septique (44). Dans de rares cas, cela peut également se produire malgré des membranes amniotiques intactes, ce qui peut aussi en résulter à une mortalité *in utero* ou quelques heures après la naissance (45). Aujourd'hui, environ 98% des nouveaux-nés colonisés par GBS restent en bonne santé, mais 1 à 2% ont des chances de développer une infection invasive à GBS (45).

Les infections nosocomiales et communautaires sont probablement impliquées dans certains cas de LOD, mais les facteurs de risque ne sont pas encore bien compris. En effet, pour un nourrisson avec une LOD dont la mère a le même sérotype de GBS, le mécanisme précis de la transmission horizontale mère-enfant n'est pas identifié (41). La LOD peut aussi causer de sérieux problèmes de santé aux bébés. Le problème le plus souvent rencontré est la méningite. La LOD se distingue avec des symptômes progressifs (fièvre, léthargie, irritabilité, mauvaise alimentation et tachypnée) liés à la bactériémie, sans aucune atteinte

pulmonaire et une incidence élevée (~ 50%) de la progression vers la méningite. En comparaison avec les cas d'EOD, une proportion plus élevée de cas de LOD manifestent la méningite (33). En général, environ 30 à 50% des survivants de la méningite ont des séquelles neurologiques permanentes, y compris les déficits auditifs, le retard mental et la cécité (5, 45). D'autres complications peuvent aussi survenir dont la démence, l'hydrocéphalie, l'infarctus et la thrombose veineuse cérébrale ainsi que des abcès au cerveau (29, 31, 46, 47).

1.2.3 Adultes et personnes âgées avec une immunité compromise

Le nombre d'infections invasives chez les adultes est en constante augmentation. L'âge (65 ans et plus) est un facteur de risque majeur pour l'infection à GBS (35). Cette augmentation ne corrèle pas avec une colonisation plus accrue chez cette catégorie de personnes. En effet, la prévalence de la colonisation à GBS chez les adultes ou les personnes âgées en bonne santé (25%) est similaire à celle chez les femmes en âge de procréer (6). Au Canada, plus de 70% des personnes âgées ont une condition médicale sous-jacente ou un facteur prédisposant dont le diabète, l'obésité, les maladies pulmonaires ou la vie en résidence (6, 35, 48). Ces conditions médicales peuvent prédisposer aux infections, dont celles causées par GBS, en altérant le système immunitaire. En effet, il a été démontré que chez les personnes obèses, la capacité de chimiotactisme est affaiblie, la différenciation des macrophages est altérée et la production de cytokines est dérégulée (49). Dans le cas du diabète, dont l'obésité est intimement reliée, est également une condition médicale connue pour être associée à des altérations de la peau ou des lésions des muqueuses et augmente ainsi le risque de maladies invasives (la première barrière physique étant alors compromise) (36). Un environnement institutionnel fermé favorise l'exposition régulière à GBS par le contact avec les travailleurs de la santé, d'autres résidents ainsi que le personnel soignant quand l'hygiène des mains est déficiente (6). Les maladies causées par GBS peuvent se présenter sous une grande variété de manifestations cliniques (voir à la page suivante).

Tableau II. Signes cliniques chez les adultes infectés par GBS.

Underlying condition	Younger adults	Older adults
	<65 years	≥65 years
Skin or soft-tissue infection	++++	++++
Urinary tract infection	+	++++
Pneumoniae	++	+++
Bacteremia with no identified focus	+++	+++
Arthritis	+++	++
Osteomyelitis	++	+
Meningitis	+	+
Endocarditis	+	+
Peritonitis	+	+
Vascular catheter-associated infection	+	+
Postoperative infection	+	+

Version adaptée d'Edwards *et al.*, 2005 (6).

Abbreviations : +++, most commonly observed (>20% of subjects); +++, commonly observed (>10% to 20% of subjects); ++, occasionally observed (5%-10% of subjects); + rarely observed (<5% of subjects).

Sans égard à l'âge, les infections de la peau et des tissus mous sont les manifestations les plus courantes chez l'adulte (34, 35, 50). Les lésions cutanées sont souvent considérées comme une porte d'entrée (tissus nécrotiques, abcès, cellulites, ulcères et plaies) (35). Les ulcères de décubitus et les ulcères aux pieds infectés ainsi que le diabète sucré sont des conditions de prédisposition communes chez les personnes âgées ou les personnes immunosupprimées (36). La bactériémie sans aucune source évidente est une manifestation clinique de la maladie invasive causée par GBS pour 15% des adultes (50). Les infections urinaires et la pneumonie, sont rarement signalées chez les jeunes adultes alors que c'est le diagnostic le plus fréquent chez les adultes âgés de plus de 70 ans (6, 50).

1.3 Étapes de la pathogénèse et les facteurs de virulence associés

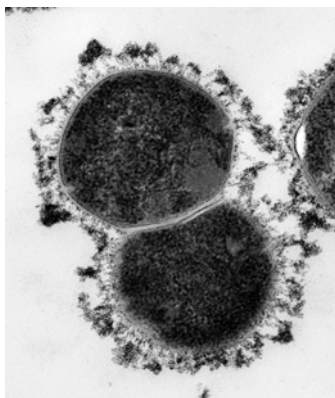


Figure 1. Image de GBS de type III par microscopie électronique (51).

GBS est une bactérie encapsulée à Gram +, β -hémolytique, possédant une gamme de phénotypes de résistance immunitaire et de toxines qui le rendent capable de provoquer des maladies graves chez l'hôte (28, 29). Il produit de courtes chaînes et des diplocoques de cellules sphériques ou ovoïdes et partage sa structure de base avec de nombreuses bactéries à Gram + telles que d'autres streptocoques, staphylocoques et du genre *Listeria*. De plus, GBS habite des niches écologiques spécifiques (l'appareil génital féminin et le tractus gastro-intestinal chez les hommes et les femmes). L'adaptation de GBS pour une coexistence avec l'hôte implique une pression de sélection autant chez GBS que chez l'hôte, ce qui a favorisé des mécanismes par lesquels l'immunité de l'hôte peut discriminer entre la colonisation et l'invasion (32). La physiopathologie des infections à GBS implique que cette bactérie peut rapidement s'adapter aux différentes conditions de croissance, y compris le pH, l'osmolarité et les variations de température (52, 53). En plus de l'antigène du Groupe B (GBC), GBS produit différentes CPSs et protéines exprimées soit à la surface de la paroi bactérienne ou soit sécrétées.

1.3.1 Facteurs de virulence

GBS exprime un large éventail de facteurs de virulence associés à la surface ou de facteurs sécrétés qui interviennent dans les interactions spécifiques avec les cellules de l'hôte, qui interfèrent avec les mécanismes d'élimination par le système immunitaire inné (5), qui contribuent de manière significative à des lésions tissulaires au site local d'infection et qui favorisent une réponse inflammatoire systémique de l'hôte (46). Pour de plus amples informations sur les différents facteurs de virulence, Doran *et al.* 2004, offrent une bonne revue de littérature à ce sujet (46).

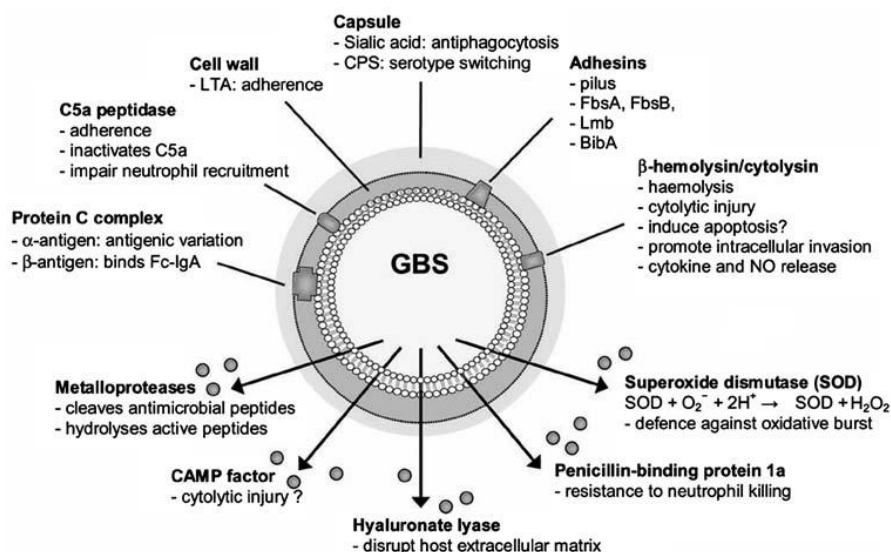


Figure 2. Schéma des facteurs de virulence de GBS impliqués dans l'adhésion, l'invasion et l'échappement à l'élimination par le système immunitaire inné.

Cette figure illustre les principaux facteurs de virulence, mais la découverte de nouveaux facteurs est continue (36).

Abbreviations: LTA, acide lipotéichoïque; CPS, capsule polysaccharidique; Fbs, protéine de liaison au fibrinogène; Lmb, 'laminin-binding protein'; BibA, adhésine bactérienne immunogénique de GBS.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés davantage à la CPS et ce facteur de virulence sera détaillé ci-dessous.

1.3.1.1 Capsule polysaccharidique : un facteur de virulence clé

Les **CPSs**, un réseau structuré de polymères à haut poids moléculaire, sont ubiquitaires et présentes à la surface d'une large gamme d'espèces bactériennes. La CPS constitue souvent la couche la plus externe de la bactérie et peut moduler les interactions directes entre la bactérie et son environnement immédiat et est considérée comme un facteur de virulence majeur et essentiel pour causer des infections chez les animaux ou végétaux. Les CPSs ont plusieurs rôles dont la prévention de la dessiccation, l'adhésion ainsi que la résistance spécifique et non spécifique aux défenses de l'hôte. Les CPSs sont généralement liées à la surface cellulaire de la bactérie par l'intermédiaire de liens covalents à des molécules phospholipidiques ou au lipide A (12, 14). Comme mentionné

précédemment, GBS est sérologiquement classé en dix sérotypes (Ia, Ib, II-IX) sur la base de différences antigéniques dans les CPSs (36). Les structures de 9 types de CPS de GBS (le type IX n'étant pas caractérisé) sont similaires dans leur composition en monosaccharides et dans certains motifs structuraux, mais ils diffèrent suffisamment pour être antigéniquement distincts. En effet, les structures des unités répétitives de polysaccharides (PRU) de ces CPSs comprennent le glucose (Glc), le galactose (Gal) et l'acide N-acétylneuraminique (acide sialique). Cependant, contrairement aux autres types, les types VI et VIII ne contiennent pas le N-acétylglucosamine (GlcNAc). De plus, le rhamnose (Rha) se retrouve seulement chez le sérotype VIII (8). Ainsi, l'individualité de la CPS des sérotypes se repose sur la synthèse distincte des unités oligosaccharidiques et/ou les façons différentes de répéter les PRUs.

Bien que la structure physique de la CPS de chaque sérotype de GBS soit unique, tous les types ont l'acide sialique lié en position terminale du Gal en $\alpha 2,3$. Cette configuration est identique à l'acide sialique retrouvé chez les cellules de mammifères (13). Il a été récemment découvert que GBS peut modifier l'acide sialique de sa CPS par O-acétylation (54). Chez les types Ia, II et III, l'acide sialique dans la CPS est un épitope conformationnel dominant et important pour la reconnaissance d'anticorps (Ab) spécifiques protecteurs, contrairement au type V (55). Le locus *cps* dans chaque sérotype est organisé de manière similaire avec des gènes impliqués dans la régulation et la longueur des chaînes saccharidiques, de la structure et de la polymérisation des PRUs ainsi que dans la synthèse de l'acide sialique. La Figure 3 montre en exemple le locus *cps* chez GBS de type III.

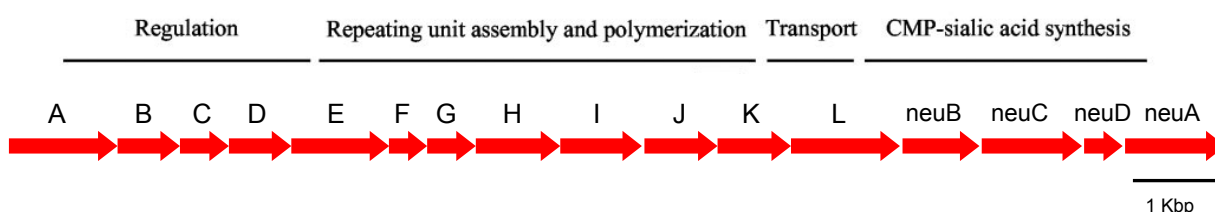


Figure 3. Locus *cps* de GBS de type III.

Version adaptée de Chaffin *et al.* 2005 (15).

Chaque flèche correspond à un gène et la lettre détermine le nom du gène du locus *cps* de GBS de type III (par exemple, *cpsA*). La principale fonction attribuée à chacun des gènes est décrite au-dessus des flèches et des lettres.

Une autre caractéristique intéressante du locus *cps* est que les gènes des glycosyltransférases, dans la région centrale, sont variables en nombre et en séquence et sont responsables des liens spécifiques des sucres dans le polysaccharide (PS) de chaque sérotype, définissant ainsi la composition et la structure de la CPS (voir Figure 4). Cela semble être un thème commun dans la structure de loci de CPSs de nombreuses bactéries encapsulées et pourrait expliquer les différences en terme de quantité de sérotypes variés dans une même espèce (plus de 90 sérotypes différents chez *S. pneumoniae*) (8).

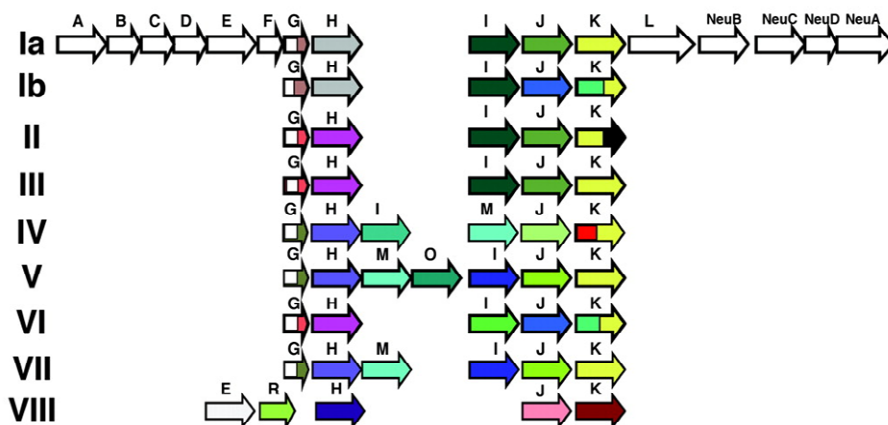


Figure 4. Schéma du locus de la capsule polysaccharidique des sérotypes de GBS.

Les gènes *cpsA* à *E* et *cpsL* ainsi que *neuB* à *D* sont conservés dans les 9 sérotypes. La couleur à l'intérieur de chaque flèche indique le degré de similarité de la séquence d'acides aminés à celles codées par d'autres cadres de lecture ouverts. Un écart a été introduit entre *cpsH* et *cpsI* pour permettre un alignement des cadres de lecture ouverts correspondants (8).

Plusieurs des souches de GBS isolées de cas de maladies invasives sont encapsulées. Dans des modèles d'infection chez les animaux, les mutants isogéniques déficients en CPS sont rapidement éliminés par l'hôte comparativement à leur souche parentale (ou 'wild-type' [WT]) (56). L'acide sialique assure la protection de la bactérie en empêchant le dépôt de C3 actif du complément sur la surface bactérienne (5). En effet, le dépôt de C3, le clivage et la dégradation subséquente en fragment C3b actif conduit, par extension, à l'opsonisation et à l'élimination des bactéries par les cellules phagocytaires ou par la lyse via le complexe d'attaque membranaire (MAC). Ces interactions sont essentielles pour la défense de l'hôte contre l'infection bactérienne invasive. L'acide sialique se lie avec une haute affinité au facteur H, un contre-régulateur du complément et favorise l'inactivation du C3b (iC3b) et le blocage ultérieur de la voie alterne du complément (57).

1.3.1.2 Autres facteurs de virulence

Même si la CPS est le facteur de virulence le plus important dans la pathogenèse de maladies causées par GBS, le rôle des composants de sa paroi et de ses protéines de surface ou protéines sécrétées n'est pas négligeable et reste toujours d'actualité (58, 59).

La paroi cellulaire des bactéries à Gram + contient deux types de polymères anioniques: les acides téichoïques (liés de manière covalente au peptidoglycane [**PGN**]) et les acides lipotéichoïques (**LTA**) (comprenant des résidus D-alanine [**D-Ala**]). L'incorporation de résidus de D-Ala dans le LTA chez GBS nécessite l'activité de gènes qui sont codés par l'opéron *dlt* et permet la modulation de la charge à la surface bactérienne (53). Le PGN en synergie avec le LTA peut déclencher la réponse inflammatoire dans l'hôte et provoquer un choc septique (60). En effet, le LTA active les leucocytes, stimule une génération exacerbée de cytokines pro-inflammatoires et de molécules cytotoxiques et peut, ultimement, causer la mort (61).

Certaines protéines sécrétées ont un pouvoir cytolytique. Les hémolysines sont souvent impliquées comme facteurs de virulence chez plusieurs espèces bactériennes. C'est le cas de la β -hémolysine/cytolysine (**β -H/C**) chez GBS, une toxine comparable à la streptolysine S de *S. pyogenes* qui est un pathogène responsable de diverses maladies invasives (62, 63) et le **facteur CAMP**. Leurs activités cytolytiques permettent de former des pores sur diverses cellules dont les cellules endothéliales et épithéliales ainsi que l'invasion intracellulaire et la relâche de cytokines et de l'oxyde nitrique (NO). L'expression de la β -H/C corrèle avec la gravité de la maladie et des dommages aux tissus alors que le facteur CAMP n'a pas un rôle primordial dans le développement de la maladie invasive causée par GBS (64). L'hyaluronate lyase (**HL**) peut aussi contribuer à la capacité d'invasion de GBS. Sa fonction principale est la dégradation de l'acide hyaluronique en PS insaturés et pourrait avoir un rôle dans l'invasion et dans la survie intracellulaire chez les macrophages (64, 65).

La protéine de surface C à une structure antigénique soit en α ou soit en β et se trouve principalement chez les types Ia, Ib et II de GBS (62). La protéine C α (**ACP**) interagit spécifiquement avec des glycosaminoglycanes à la surface de cellules épithéliales de l'hôte pour favoriser l'internalisation bactérienne. D'autre part, la protéine C β (**BCP**) a des sites de

liaison pour le facteur H et pour le fragment Fc de l'immunoglobuline (Ig) A et est donc susceptible de contribuer à l'évasion immunitaire (64).

GBS exprime aussi plusieurs protéases. Les protéases bactériennes jouent un rôle essentiel dans la colonisation et l'évasion du système immunitaire de l'hôte, dans l'acquisition de nutriments pour la croissance et la prolifération bactérienne, la dissémination et les dommages aux tissus lors de l'infection (66). Plusieurs protéases ont été décrites pour GBS. Par exemple, la 'C5a-peptidase b' (**Scpb**) clive le composant C5a de la voie du complément de sorte que le C5a peut encore se lier à des bactéries, mais ne peut pas agir comme une chimiotaxine. Cette protéase peut également se lier à la fibronectine (64). La protéine nommée **CspA**, elle, présente une homologie avec la famille des protéases dont les protéases C5a de streptocoques pathogéniques (67) ainsi que les caséinases exprimées par des bactéries à Gram + non pathogéniques. Finalement, la CspA peut se lier au fibrinogène (46).

La protéine **Spb1** et la 'laminin-binding protein' (**Lmb**) sont des adhésines exprimées par GBS pour favoriser son adhésion sur les cellules épithéliales ou endothéliales (68). La Lmb se lie à la laminine chez l'hôte et présente une homologie avec les membres de la famille des protéines Lra1 (69) qui ont été impliqués dans l'adhérence et le transport de métal chez les bactéries à Gram +. Les **pili**, exprimés chez GBS et également connus sous le nom *fimbriae*, sont des organelles polymériques non-flagellaires souvent impliquées dans l'adhérence de bactéries aux cellules hôtes et aux tissus pendant la colonisation (5, 70). L'opéron des pili chez GBS code pour des protéines, dites sortases, requises pour l'assemblage complet des pili (PilA, PilB et PilC) (71). De plus, PilB favorise la résistance à la destruction intracellulaire (5). Finalement, d'autres protéines de surface peuvent se lier au fibrinogène, à la fibronectine ou au plasminogène, telles que les protéines de liaison au fibrinogène A et B (**FbsA/B**) (71, 72), la 'serine-rich repeat domain protein 1' (**Srr1**) (73) et l'**α-énolase** qui est similaire à celle retrouvée chez *S. pyogenes* (64). L'adhésine bactérienne immunogénique de GBS (**BibA**) peut se lier au composant C3bp, un composant de la voie classique du complément, et favorise la résistance au système immunitaire (5). Tout récemment, une nouvelle adhésine, **HvgA**, a été caractérisée et se retrouve chez un clone hypervirulent de GBS de type III et aurait un impact important dans les méningites néonatales (40, 74, 75).

Au niveau intracellulaire, les superoxydes dismutases (Sod) convertissent les anions superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. Ces enzymes constituent un des mécanismes principaux des bactéries contre le stress oxydatif et joue un rôle de défense chez certaines bactéries dont GBS qui en exprime une, la **SodA** (76). Finalement, les 'penicillin-binding proteins' (**PBP**) sont traditionnellement connues pour leur rôle dans la biosynthèse du PGN. Le mécanisme par lequel les PBPs contribuent à la virulence n'a pas encore été bien déterminé (77). Chez GBS, la **PBP1a** semble favoriser la résistance intracellulaire (78).

1.3.2 Étapes de la pathogenèse

Le processus par lequel GBS cause une infection est complexe et multifactorielle. Bien que ce pathogène se soit bien adapté à la colonisation asymptomatique chez l'humain adulte, il n'en reste pas moins que GBS peut potentiellement être dévastateur chez un hôte plus sensible. Le développement de la maladie causée par GBS reflète la colonisation de l'épithélium vaginal ou d'une muqueuse, de l'invasion des barrières épithéliales ou la pénétration dans le placenta, la résistance à la l'élimination par le système immunitaire permettant ainsi la survie dans la circulation sanguine et, dans les cas de méningites, la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) via les cellules endothéliales. Les avancées majeures, grâce aux techniques moléculaires et le raffinement des modèles *in vitro* et *in vivo*, ont permis d'apprendre davantage sur les éléments clés de la pathogénèse des maladies causées par GBS.

Pour coloniser et envahir, GBS se doit de s'adapter à son hôte par l'expression de protéines de surface spécifiques pour l'hôte dont certaines sont seulement exprimées en contact avec l'hôte et non dans des cultures en laboratoire. Ce processus se fait par l'intermédiaire d'un système de régulation à deux composants. Un composant (par exemple, une protéine 'sensor') est chargé de détecter et de communiquer les stimuli externes, tandis que l'autre composant (par exemple, une protéine de régulation) réagit à ces signaux en activant ou en réprimant des gènes spécifiques, conduisant ainsi à des fonctions bactériennes appropriées (79). Ce système a été reconnu comme une stratégie bactérienne pour surmonter les facteurs de stress environnementaux tels que le pH, la température et l'osmolarité, mais également pour adhérer aux cellules de l'hôte et exprimer des facteurs de virulence (36).

De par son importance et sa virulence, cette partie de la revue de littérature se concentrera sur la pathogénèse de GBS de types III et V, mais il est important de souligner que des différences entre les sérotypes existent dans les mécanismes utilisés pour induire la maladie.

1.3.2.1 Colonisation: l'adhésion et l'invasion des surfaces épithéliales

L'intégrité et la fonctionnalité de la muqueuse et de la peau représentent la première ligne de défense de l'hôte. Une perte d'intégrité de ces barrières permet, non seulement à GBS de quitter sa niche écologique naturelle, mais de provoquer aussi une maladie invasive chez l'hôte (36).

Ce n'est pas une surprise que GBS adhère à une variété de cellules épithéliales humaines et murines (46). La pathogénèse de la maladie causée par GBS peut d'abord être attribuée à la colonisation de la muqueuse, en particulier de l'appareil génito-urinaire. Comme mentionné précédemment, environ 25% des adultes en bonne santé sont porteurs de GBS. GBS se lie avidement aux cellules épithéliales humaines malgré des conditions de pH acide qui sont caractéristiques de la muqueuse vaginale. Les avis sont contradictoires concernant l'effet de la **CPS** sur l'adhésion/invasion de GBS chez les cellules de l'hôte et son rôle serait probablement mineur puisque la CPS n'empêche pas GBS d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales (46, 80, 81). L'adhésion aux épithéliums se produit par l'intermédiaire d'adhésines exprimées par GBS, une composante nécessaire à la colonisation. De multiples adhésines existent avec des affinités différentes pour les structures épithéliales avec un attachement qui se produit en deux étapes, soit une faible affinité suivie par une forte affinité. Une faible affinité de GBS avec les cellules épithéliales est régulée par les différences de charge ionique grâce au **LTA**, tandis que des interactions de plus forte affinité avec les cellules de l'hôte sont régulées par une série de protéines de surface (46). De plus, GBS se lie efficacement à des composants de la matrice extracellulaire (ECM) qui sont, en quelque sorte, des récepteurs de surface dont la fibronectine, le fibrinogène, la laminine et la cytokératine 8 (36, 82). À leur tour, ces composants se lient aux protéines de surface des cellules de l'hôte, les intégrines entre autre (5). La fibronectine, la laminine et la kératine sont présentes dans le placenta et le liquide amniotique et peuvent également jouer un rôle dans la persistance au cours de la maladie bactérienne (64). Plusieurs adhésines de GBS sont impliquées et rapportées pour

jouer un rôle dans les processus d'adhérence et de colonisation dont **Hgva**, **ScpB**, **Spb1**, **ACP**, **Lmb**, **Srr1**, **FsbA/B**, **α -Enolase**, et **PilB** (5, 46, 64, 75, 83).

Une fois adhérent, GBS est capable d'envahir les cellules eucaryotes, favorisant ainsi la pénétration bactérienne à travers les barrières cellulaires de l'hôte telles que les membranes chorio-amniotiques et les muqueuses des voies respiratoires (36). Pour ce faire, GBS utilise diverses toxines sécrétées ou des facteurs de virulence à la surface cellulaire (dites invasines) pour favoriser son entrée et sa survie dans les cellules de l'hôte. L'entrée dans les cellules épithéliales fournit à GBS une niche exceptionnelle pour sa survie intracellulaire, pour également entraîner une rupture de l'intégrité des tissus de l'hôte et pour provoquer une réponse inflammatoire (5). Certaines des invasines produites par GBS interviennent dans la pénétration de cellules épithéliales dont **ScpB**, **SpB1** et **ACP** (5, 46, 64). Plus précisément, l'absence des gènes codant pour la protéine ScpB ainsi que l'ACP réduit significativement l'invasion de GBS dans les cellules épithéliales (46).

En plus de l'invasion, GBS peut induire des lésions aux tissus pour faciliter sa propagation. Par exemple, GBS sécrète l'**HL** qui dégrade des composants importants de la ECM retrouvés dans les tissus dont le placenta. GBS possède une gamme impressionnante de toxines pouvant endommager les cellules de l'hôte, des peptidases extracellulaires, des protéases, des nucléases et la collagénase, permettant ainsi la libération de nutriments pendant la colonisation. Le **β -H/C**, le **facteur CAMP** et la **CspA** sont des exemples de toxines de GBS. Beaucoup de ces enzymes contribuent aussi à la destruction locale des tissus pouvant faciliter ainsi la dissémination de GBS dans les tissus (64).

De nouvelles données indiquent que GBS peut traverser des monocouches de cellules par une voie paracellulaire. En effet, il a été démontré par microscopie électronique que GBS peut s'associer à des complexes protéiques des jonctions serrées. Dans un modèle d'insert Transwell, recréant la fonction de barrière des cellules épithéliales, GBS se déplace par transcytose grâce à l'ouverture des jonctions serrées, et ce, sans altérer la résistance électrique transépithéliale (81). La protéine **ACP** serait impliquée dans ce processus grâce à son interaction avec des glycosaminoglycanes à la surface des cellules épithéliales (5, 84).

D'un point de vue moléculaire, GBS active de nombreuses protéines pour le réarrangement du cytosquelette et permettre ainsi son internalisation. Parmi ces protéines, il y a les 'guanosine triphosphatases' (GTPases) de la famille des Rho qui sont de petites molécules de signalisation omniprésentes dans le cytosol des cellules eucaryotes et sont connues pour être manipulées par des bactéries pathogènes à la surface de la cellule pour déclencher la polymérisation et le réarrangement du cytosquelette par l'actine (85). La voie d'activation par le 'phosphoinositide 3-kinase' (PI3K)/Akt est aussi une voie de transduction impliquée dans l'internalisation de GBS par la phosphorylation et l'activation d'Akt qui déclenche une modulation du réarrangement cytosquelettique chez les cellules de l'hôte. La phosphorylation d'Akt a été démontrée dans la réponse des cellules épithéliales face à GBS et l'inhibition de cette voie signalétique réduit son invasion (5).

Finalement, GBS est capable d'envahir les cellules épithéliales chorioniques mais pas amniotiques (86). Néanmoins, il peut traverser les membranes placentaires et affaiblir leur efficacité, un processus qui est causé par la production locale de radicaux d'oxygène et de la prostaglandine E2. Suite à ces changements, GBS peut ainsi accéder au fœtus au sein de la cavité amniotique et induire la rupture de la membrane placentaire ou déclencher un accouchement prématuré (46, 87). L'invasion cellulaire joue un rôle principal dans l'établissement des maladies causées par GBS chez les nouveaux-nés, en particulier chez les prématurés, de par ses dommages à l'épithélium pulmonaire, des dommages résultant largement de l'action de la β -H/C qui lyse les cellules épithéliales et compromet la barrière pulmonaire (46, 88). En effet, des souches de GBS mutantes dépourvues de β -H/C sont moins aptes à pénétrer les barrières pulmonaires et à provoquer une infection systémique que les souches WT dans un modèle de pneumonie chez le lapin (5). La figure à la page suivante résume les facteurs impliqués dans l'adhésion et l'invasion de GBS.

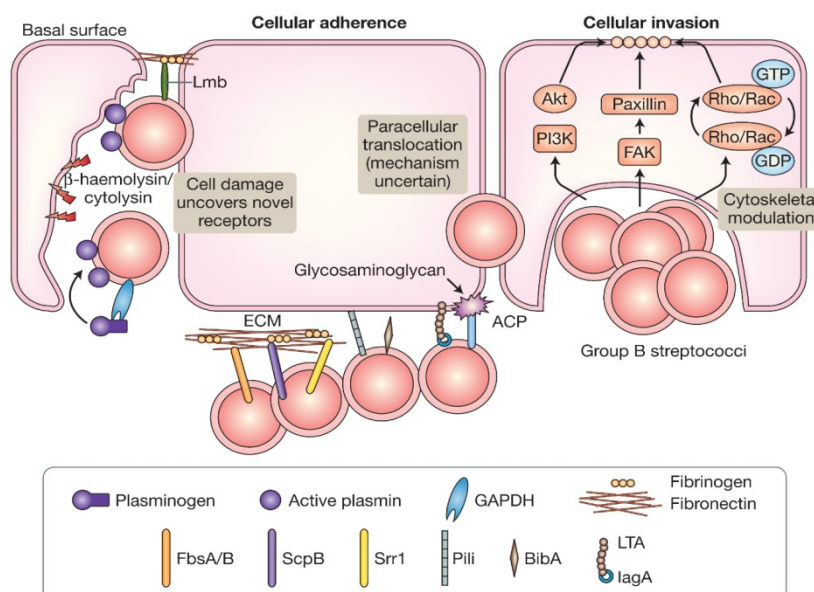


Figure 5. Mécanismes d'adhésion cellulaire et d'invasion de GBS chez l'hôte.

Maisey *et al.* 2008 (5). Les protéines FbsA/B, ScpB, Srr1, pili, BibA, ACP ainsi que le LTA favorisent l'adhésion de GBS sur les cellules de l'hôte et aux composant de l'ECM comme le fibrinogène et la fibronectine. La β -H/C amène également l'adhésion de GBS, possiblement en détruisant les barrières de l'hôte pour exposer des récepteurs membranaires. La présence d'une GAPDH permet d'activer le plasminogène et dégrader l'ECM. L'invasion intracellulaire de GBS est dépendant du réarrangement cytosquelettique chez l'hôte par les voies PI3K/Akt et FAK et la famille Rho des GTPases. Alternativement, GBS peut aussi traverser la barrière épithéliale de l'hôte par une route paracellulaire dont le mécanisme n'est pas connu. Plusieurs adhésines de GBS contribuent également à l'invasion (FbsB, ScpB, pili, LTA et ACP).

Abbreviations: β -H/C, β -hémolysine/cytolysine; ACP, protéine C α ; BibA, adhésine bactérienne immunogénique; ECM, matrice extracellulaire; FAK, kinase de l'adhérence focale; FbsA/B; protéine de liaison au fibrinogène A et B; GAPDH, 'glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase'; GBS, *Streptococcus* du Groupe B; GDP, guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate; Lmb, 'laminin-binding protein', LTA, acide lipotéichoïque; PI3K, 'phosphoinositide 3-kinase'; Srr1, 'serine-rich repeat domain protein 1'.

1.3.2.2 Résistance à l'immunité innée et à l'élimination bactérienne

Une fois que GBS pénètre les barrières cellulaires pour atteindre le sang ou les tissus profonds, il s'expose inévitablement au système immunitaire et une réponse immunitaire plus large sera mobilisée pour éliminer l'infection. Au centre de cette réponse,

se trouve les cellules phagocytaires de l'hôte dont les neutrophiles et les macrophages. L'élimination efficace de GBS par ces cellules dépend de l'opsonisation par des Abs spécifiques et/ou le complément dans le sérum (5). Pour survivre *in vivo*, GBS se doit d'échapper à l'immunité de l'hôte par divers mécanismes dont la variation antigénique, la dégradation enzymatique des composants immunitaires et l'inhibition du système immunitaire. La capacité de GBS à produire des infections invasives est possible grâce à plusieurs facteurs de virulence qui lui permettent de résister à la mort intracellulaire régulée par le complément et/ou de neutraliser les activités bactéricides des neutrophiles et des macrophages (5) (voir Figure 6).

En termes d'évasion immunitaire, un des facteurs de virulence le plus étudié est la **CPS** et elle est sans contredit un des plus importants. Comme mentionné précédemment, la quasi-totalité des souches de GBS provoquant des maladies humaines sont encapsulées (46). Les CPSs de GBS, en particulier la CPS du type III, sont faiblement immunogènes et modulent la reconnaissance de GBS par le système immunitaire en masquant les protéines de surface. De plus, la CPS sialylée de GBS le protège de l'élimination intracellulaire régulée par le complément. Des mutants isogéniques de GBS dépourvus en CPS ou tout simplement en acide sialique, dont le C3b peut se lier en grandes quantités à la surface de ces bactéries, sont plus sensibles à l'élimination par les neutrophiles humains ou les macrophages, favorisant la survie de l'hôte comparativement à la souche WT dans un modèle d'infection chez le rat (46, 89, 90). De plus, une étude a démontré que la mobilisation de la voie du complément est critique pour la réponse immunitaire humorale à la CPS de GBS. Les cellules B de la zone marginale ou les cellules dendritiques (DCs) de souris C3^{-/-} n'arrivent pas à reconnaître et à interagir avec la CPS de GBS, et par conséquent, amène une faible production d'IgM ou d'IgG spécifiques contre la CPS (91).

Une hypothèse émerge concernant l'évasion immunitaire de GBS par l'utilisation d'un mécanisme de mimétisme moléculaire. En effet, l'acide sialique en position terminale $\alpha 2,3$ de la CPS de GBS est identique à celui couramment retrouvé à la surface de toutes les cellules de mammifères. Il a été démontré que, comme l'acide sialique humain, l'acide sialique de la CPS de GBS est reconnu par les 'sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins' (Siglecs) sur les leucocytes humains, une famille de récepteurs de surface ayant un pouvoir régulateur négatif sur l'activation des cellules de l'hôte. Cette interaction suggère que l'évolution bactérienne de la sialylation de la CPS aurait pour but d'imiter les antigènes

de l'hôte et d'atténuer sa réponse immunitaire pour permettre à GBS d'échapper au système immunitaire en modulant la fonction des phagocytes (5, 92).

Des protéines de GBS peuvent aussi aider à réduire l'action du complément. Par exemple, la **ScpB** inactive la molécule C5a et réduit la mobilisation des neutrophiles alors que la protéine **BibA** se lie à la molécule C3bp humaine et contribue aussi à la virulence dans un modèle d'infection murin (5). La protéine **ACP**, elle, par sa liaison au facteur H, bloquerait le dépôt de C3b à la surface bactérienne (93). Les protéines **BCP** et **CspA** joueraient elles aussi un rôle dans l'inactivation du complément (5, 64).

Comme nous pouvons le constater, les facteurs de virulence mentionnés ci-dessus, y compris la CPS, nuisent à l'efficacité de la voie du complément, mais n'empêchent pas GBS d'être phagocyté. En effet, GBS encapsulé est internalisé grandement dans les macrophages et y survit également bien pendant plus de 24 heures, une période qui, *in vivo*, est plus que suffisante pour maintenir une bactériémie et développer, par exemple, la méningite. Par ailleurs, une longue survie intracellulaire nécessite plusieurs mécanismes tels que l'inhibition de la fusion du phagosome et du lysosome, l'inhibition de la stimulation du métabolisme oxydatif, la résistance aux enzymes lysosomales, l'atténuation de l'acidification du phagosome ou même l'absence d'Abs (18, 94).

En effet, une fois internalisé et dans le phagosome, GBS doit faire face à la libération toxique et rapide de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) produits lors du stress oxydatif. Parmi les défenses de GBS pour neutraliser le stress oxydatif, nous pouvons noter entre autre l'enzyme **SodA** (5, 76) ainsi que d'autres protéines (5, 95). Plus précisément, SodA, une métalloprotéine (dont le cofacteur est le manganèse), possède une activité enzymatique qui favoriserait la catalyse de la dismutation du superoxyde en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène, ce qui réduirait le stress oxydatif intracellulaire. En effet, il a été démontré que SodA permet à GBS de survivre plus longtemps dans les macrophages murins (5). Les peptides antimicrobiens (AMP) ont un large spectre d'activités et ont un effet sur la survie intracellulaire bactérienne par leur attraction électrostatique aux charges négatives des surfaces bactériennes, ayant comme résultante la création de pores et la perturbation de l'intégrité membranaire bactérienne (96). GBS résiste aux AMPs grâce, entre autre, à l'incorporation de résidus **D-Ala** chargés positivement au **LTA**, réduisant ainsi l'électronégativité de surface et l'affinité pour les peptides cationiques (46, 53). Des études

ont montré aussi l'importance des protéines **PBP1a** et de **PilB** de GBS dans la résistance aux AMPs (5, 46, 53).

L'induction de l'apoptose, ou la mort cellulaire programmée, est un mécanisme de défense alternatif permettant aux bactéries d'éviter l'élimination par les phagocytes. Le rôle de la toxine **β -H/C** dans l'induction de l'apoptose et/ou la mort cellulaire de macrophages n'est pas encore bien caractérisé. La production de cette toxine favoriserait la survie de GBS chez la souris, par exemple, par sa capacité à induire l'apoptose et la cytolysse des phagocytes (5). Cependant, il a également été démontré que l'infection *in vitro* de macrophages avec une souche mutante de GBS dépourvue de β -H/C n'améliore pas la viabilité cellulaire, indiquant que l'apoptose induite par GBS chez les macrophages peut également se produire par un mécanisme indépendant de la β -H/C (5).

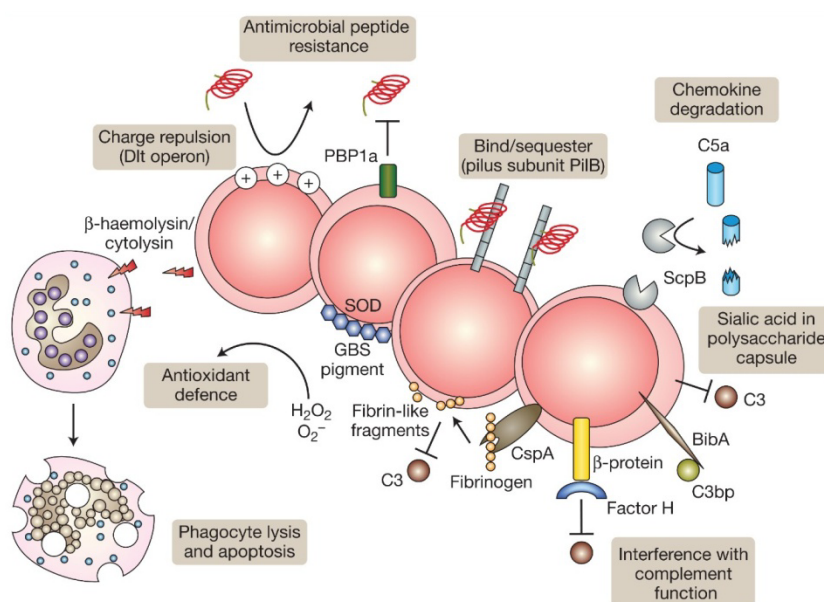


Figure 6. Mécanismes de résistance immunitaire face à GBS.

Maisey *et al.* 2008 (5). GBS exprime plusieurs facteurs pour s'évader du système immunitaire et favoriser sa survie. L'opéron Dlt est responsable de l'augmentation de l'incorporation de résidus de D-alanine dans la paroi bactérienne, ce qui réduit l'électronégativité ainsi que l'affinité aux peptides antimicrobiens (AMP). PBP1a and PilB contribuent à la résistance aux AMPs. ScpB, CPS sialylée, BibA, BCP et CspA interfèrent dans l'élimination de GBS via les composants du complément. Les propriétés des superoxydes dismutases préviennent l'élimination de GBS par les dérivés réactifs de l'oxygène des phagocytes. La β -hémolysine/cytolysine peut induire la cytotoxicité ou l'apoptose chez les phagocytes de l'hôte.

Abbréviations: BibA, adhésine bactérienne immunogénique; AMP, peptides antimicrobiens; BCP, protéine C β ; GBS, *Streptococcus* du Groupe B; PBP1a, 'penicillin-binding protein 1'.

1.3.2.3 Réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire de l'hôte face à l'infection mène souvent au développement de la septicémie et à la dysfonction des organes. La réponse pro-inflammatoire innée suite à l'infection à GBS peut contribuer à la pathologie, et ce, à travers la synthèse et la libération de cytokines, de prostaglandines et de NO. Il apparaît donc que la virulence de différentes souches peut dépendre, non seulement des génotypes différents, mais également de l'induction de différentes quantités de cytokines pro-inflammatoires (34). Plusieurs études ont démontré la capacité de GBS à induire la libération de cytokines par les monocytes ou les macrophages en culture *in vitro*. Bien que le 'tumor necrosis factor α ' (TNF- α) puisse augmenter l'élimination bactérienne par son action sur les neutrophiles, il peut également être responsable de changements physiologiques chez l'hôte pouvant être délétères lors d'une septicémie causée par GBS. En effet, une libération excessive de TNF- α en réponse à une forte bactériémie causée par GBS semble contribuer à la physiopathologie de cette infection (97). L'interleukine (IL)-1, un stimulateur connu des voies de la cyclo-oxygénase et de la lipo-oxygénase, occuperait un rôle primaire dans la cascade des cytokines délétères du choc septique. À l'inverse, la cytokine IL-12, qui est élevée de 12 à 72 heures après l'infection chez des modèles animaux, a un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire suite à une infection par GBS. Par exemple, le pré-traitement avec un Ab monoclonal neutralisant l'IL-12 conduit à une plus grande mortalité et à l'intensification de la bactériémie alors que l'administration thérapeutique de l'IL-12 est associée à une mortalité plus faible (5). En général, la production de cytokines pro-inflammatoires est accompagnée par une réponse anti-inflammatoire destinée à la modulation de cette réaction. Les cytokines IL-10 et les interférons (IFN) de types I et II ou des Abs dirigés contre des cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6) protègent les souris lors d'une septicémie causée par GBS (32). Ainsi, un équilibre entre les réponses pro- et anti-inflammatoire est important dans l'évolution de la maladie. Le **PGN** de GBS est plus efficace que le **LTA** ou la **CPS** pour induire la production de cytokines par les monocytes, en particulier le TNF- α et l'IL-1 (98). Les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des composants de GBS, dont les récepteurs de type Toll (TLR), entre autres, et leur importance dans la réponse immunitaire face à GBS seront davantage détaillés dans la

section 3.4. Par contre, nous pouvons affirmer que la réponse pro-inflammatoire causée par GBS est grandement reliée à la capacité de ses composants bactériens d'activer des récepteurs membranaires ou intracellulaires (5). En ce qui a trait au rôle du complément dans l'inflammation causée par GBS, il reste controversé (5, 46). Des études d'inhibition ont révélé que la voie de signalisation impliquant la 'mitogen-activated protein kinase' (MAPK)/ 'c-Jun N-terminal kinase' (JNK) est essentielle pour la réponse inflammatoire dépendante du facteur nucléaire κ B (NF- κ B) par les phagocytes en contact avec GBS. La voie du NO a également été impliquée dans la surproduction de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, et de l'initiation des lésions cellulaires au cours de l'infection par GBS dans le tissu pulmonaire (5). La paroi bactérienne de GBS et la protéine **β -H/C** agissent en synergie pour réguler positivement la synthase inductible de l'oxyde nitrique (iNOS) dans les macrophages murins (99). En effet, dans un modèle de souris, l'expression de la β -H/C est associée à la libération systémique de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 et l'IL-6 (5, 100). Finalement, il a été aussi démontré que la cyclo-oxygénase COX2 et la prostaglandine E2 sont induites suite à une infection à GBS *in vitro* ou *in vivo*, probablement par la voie de signalisation MAPK (5).

1.3.2.4 Pénétration de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et méningite

Une résultante d'une réponse inflammatoire de l'hôte exagérée face à une infection par GBS sont les dommages au niveau du cerveau et du système nerveux central (SNC). Pour causer la méningite, GBS doit pénétrer la BHE, une barrière spécialisée qui maintient l'homéostasie du SNC. La BHE se compose essentiellement de cellules endothéliales microvascularisées spécialisées du cerveau (BMEC), lesquelles surveillent et empêchent la circulation dans le cerveau de toxines et de bactéries grâce aux jonctions intracellulaires serrées. L'invasion intracellulaire et la transcytose des BMECs humaines *in vitro* par GBS de type III ont été démontrées et ce modèle a été utilisé pour caractériser les rôles potentiels de certains facteurs de virulence chez GBS dans l'infection au niveau du SNC (5, 101). Dans une étude chez le rat, la méningite causée par GBS est imputée à une infiltration aiguë des neutrophiles dans l'espace sous-arachnoïdien et les ventricules, par une vasculopathie et par des lésions neuronales (29, 46). Le facteur de virulence de GBS qui semble affecter la BHE est le **β -H/C** et cette toxine a été également montrée pour contribuer à l'installation de la méningite et l'apoptose neuronale (46). De plus, récemment, **HvgA** serait critique pour faciliter le passage de GBS à travers la BHE dans un modèle d'infection

murin (74). Aussi, des mutants isogéniques de GBS déficients en protéines **FbsA**, **Lmb**, ou **PiliB** ont permis de démontrer l'importance de ces protéines dans l'adhésion/invasion chez les BMECs *in vitro* (5). La production de TNF- α par les astrocytes et la microglie ainsi que l'infiltration de leucocytes semblent également contribuer à l'apoptose des neurones de l'hippocampe et une augmentation de la perméabilité de la BHE. (46). L'apoptose des phagocytes peut être désavantageuse pour l'hôte, car elle affaiblit la défense immunitaire innée et elle est délétère dans des tissus ayant un faible potentiel d'auto-régénération comme les neurones (32). Une étude récente, qui va à l'encontre des précédentes, a part ailleurs suggéré que l'adhésion *in vitro* aux cellules des méninges humaines et les astrocytes fœtaux ne serait pas influencée par l'expression de la β -H/C, ni par les différences dans les **CPS** (sérotypes) ou ni par l'absence même de la CPS (102). Le choix du type de cellules et les méthodes de mesure de l'adhérence peuvent expliquer les différences observées.

Nous pouvons donc conclure que le processus par lequel GBS cause une infection est complexe et multifactorielle et la réponse immunitaire de l'hôte joue un rôle crucial dans toutes les étapes de l'infection (autant l'immunité innée que l'immunité adaptative).

2. Aspects généraux de *Streptococcus suis*

2.1 Historique et épidémiologie

S. suis a été signalé par les vétérinaires pour la première fois dans le début des années 1950 chez des porcelets et des porcs adultes (103-105). Au départ, la classification selon Lancefield n'était pas claire et Elliot, en 1966, a démontré que *S. suis* appartenait au Groupe D (106). Grâce à des techniques d'hybridation d'ADN et d'analyses de la paroi bactérienne, *S. suis* a été officiellement reconnu comme une espèce en 1987. Ces techniques ont démontré aussi qu'il n'était pas étroitement lié aux streptocoques du Groupe D et qu'il constituait une espèce génétiquement homogène (107). *S. suis* est actuellement considéré comme l'un des pathogènes les plus importants de l'industrie porcine mondiale et est responsable de pertes économiques importantes (3).

Depuis le premier cas d'infection humaine à *S. suis* au Danemark en 1968 (108), de nombreux cas ont été signalés dans plusieurs pays européens, asiatiques ainsi qu'américains (4, 9). C'est en 1998, en Chine, qu'a eu lieu la première épidémie importante d'infection à *S. suis* chez l'homme et a causé 14 décès (109). Sept ans plus tard, en 2005, un autre épisode important d'infection, toujours en Chine, est apparu et a causé 39 décès. Durant cet épisode, tous les cas étaient reliés à des agriculteurs ayant des fermes traditionnelles (près de la maison) et ils étaient exposés directement à *S. suis* lors de la manipulation de porcs morts de causes inconnues ou qui avaient été abattus pour consommation, et ce, même s'ils étaient malades. Plus précisément, ces épidémies chinoises étaient caractérisées par une forte incidence de la maladie systémique, un taux élevé de mortalité ainsi qu'un nombre faible de cas de méningites, ce qui est loin de la présentation clinique classique d'infections à *S. suis* (4) (voir ci-dessous). L'analyse phylogénétique par 'multilocus sequence typing' (MLST) de souches de *S. suis* isolées chez des humains et des porcs malades, a montré que toutes les souches appartenaient au même clone responsable de l'épidémie de 1998 (110-112).

Comme GBS, la classification actuelle du *S. suis* est basée sur les différences antigéniques dans les CPSs et 35 sérotypes (1-1/2 et 2-34) ont été décrits (113). Toutefois, les types 32, 33 et 34 sont remis en question (114, 115). Certains ont une réaction croisée, ce qui indique que des déterminants antigéniques capsulaires sont partagés. C'est le cas

pour le type 1/2 qui a une réaction croisée avec les sérums des types 1 et 2 (116). Parmi tous les sérotypes de *S. suis*, chez le porc, le type 2 est le plus souvent isolé et est considéré comme le plus virulent dans plusieurs pays européens et asiatiques (112, 117-119). En Asie, la prévalence de *S. suis* de type 2 est d'environ 28% (120), alors qu'en Espagne et en France, il est de 51% et 69%, respectivement (117, 118). En Amérique du Nord, la distribution des sérotypes diffère de celle rapportée dans plusieurs pays européens. En effet, les types 2 (24.3%) et 3 (21%) sont ceux les plus isolés de cas cliniques chez le porc (9). Les similitudes entre les résultats du Canada et des États-Unis suggèrent un statut commun en Amérique du Nord (9, 121). Globalement, les autres sérotypes isolés à partir de cas cliniques chez les porcs sont les types 1/2, 3, 7 et 9 (9). Chez l'humain, les cas cliniques déclarés sont causés principalement par les types 2 (74%) et 14 (2%) (9).

2.2 Maladies et manifestations cliniques

Davantage associé au porc et à l'humain, *S. suis* se retrouve chez divers espèces animales dont les ruminants, les chevaux, les chats et les chiens, entre autres (113, 122-124). Similairement aux porcs, *S. suis* colonise les amygdales de ces espèces (123). Dans le cadre de cette thèse, seules les maladies et les manifestations cliniques chez le porc et chez l'humain seront abordées.

2.2.1 Porc

L'habitat naturel de *S. suis* chez le porc sont les voies respiratoires supérieures (en particulier les amygdales et les cavités nasales), les voies génitales ainsi que le tractus gastro-intestinal (113). Malgré que *S. suis* affecte les porcs de tous âges, la maladie apparaît souvent lors du sevrage et lors du mélange de troupeaux, en particulier entre 3 et 12 semaines d'âge (125). L'incidence de la maladie est très variable d'un troupeau à l'autre et même à l'intérieur d'un troupeau sur une période de temps. Différentes pratiques de gestion et/ou la présence d'autres agents pathogènes ont été suggérées comme facteurs de prédisposition aux infections à *S. suis* dont, entre autre, le stress, le surpeuplement, la ventilation ainsi que le moment du sevrage. La méningite, la septicémie, l'arthrite et l'endocardite sont les maladies les plus souvent remarquées chez le porc face à *S. suis* (113). Les premiers signes de l'infection se caractérisent par l'anorexie, la dépression et une

fièvre élevée (jusqu'à 42 °C), les yeux vitreux et une rougeur des muqueuses (113, 126, 127). Après plusieurs jours, les animaux malades peuvent présenter des signes neurologiques dont les convulsions et l'ataxie (126-128). Les porcs infectés présentent généralement des signes cliniques et des lésions reliés soit à l'appareil respiratoire, soit au SNC mais pas les deux (128). De plus, *S. suis* est souvent isolé en combinaison avec d'autres agents pathogènes respiratoires dont *Actinobacillus pleuropneumoniae* et *Haemophilus parasuis* (125), ce qui suggère que *S. suis* peut agir en tant que pathogène opportuniste au niveau du tractus respiratoire. Certains virus, comme le 'porcine reproductive and respiratory syndrome' (PRRS) et le circovirus porcin (PCV), peuvent prédisposer les porcs à l'infection à *S. suis* (129, 130).

La transmission de *S. suis* peut se faire à la fois verticalement et horizontalement. Lors de la naissance, les porcelets peuvent s'infecter via le tractus génital (transmission verticale) (131). De plus, ils peuvent acquérir la bactérie après la naissance lors d'un contact étroit avec la truie infectée à *S. suis* ainsi que par contact de matières fécales ou avec d'autres porcelets de la portée (transmission horizontale) (113). Il faut souligner que ce n'est pas tous les porcs en contact avec *S. suis* qui vont développer une infection. Par exemple, il a été proposé, qu'une fois le porc est infecté à *S. suis*, il peut le rester de façon asymptomatique toute sa vie (132). Les porcs peuvent abriter aussi différentes souches de *S. suis* (même de différents sérotypes) dans leurs cavités nasales et les amygdales sans corrélation avec un état pathologique spécifique (133) et même un troupeau peut abriter différents sérotypes de *S. suis* (113).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour lutter contre les infections à *S. suis* dans les porcheries dont l'utilisation d'antibiotiques en prophylaxie ou en traitement, l'administration d'anti-inflammatoires (lors de signes de méningites), le sevrage très précoce (ou le retrait à la naissance en association avec la prise d'antibiotiques) et la vaccination (134). Plus précisément, le but du sevrage très précoce consiste à retirer les porcelets de la truie au moment où ils profitent encore de l'immunité passive qu'offre le colostrum de la mère et donc avant qu'ils succombent aux pathogènes qui peuvent se retrouver dans le milieu ambiant des installations de mise bas. Pour contrer l'infection à *S. suis*, l'amoxicilline, l'ampicilline et la gentamicine sont les antibiotiques les plus efficaces (135). Avec la résistance croissante aux antibiotiques dont la pénicilline, l'ampicilline et le ceftiofur (136), leur utilisation prudente est fortement conseillée.

2.2.2 Homme

Chez l'homme, les infections à *S. suis* ont toujours été considérées comme une maladie professionnelle, puisque la plupart des cas sont rapportés chez des personnes travaillant avec des porcs (éleveurs de porcs, inspecteurs de viande ou vétérinaires praticiens) ou en contact avec des produits dérivés de porcs (105, 111, 137). Le taux de létalité global de l'infection à *S. suis* atteint près de 13% en Europe et 20% en Asie (137). Fait intéressant, quelques cas ont été signalés en Amérique du Nord (9). Les grandes épidémies en 1998 et 2005 en Chine ont littéralement changé l'image classique de l'infection à *S. suis* (4). Aujourd'hui, l'infection à *S. suis* est devenue un important problème de santé publique dans plusieurs pays d'Asie, mais il est difficile d'évaluer le taux d'infections chez l'humain, car la déclaration de ses infections n'est pas obligatoire et un mauvais diagnostic est souvent commun (138). Il est à noter que *S. suis* est actuellement la principale cause de méningites chez l'adulte au Vietnam, la deuxième en Thaïlande ainsi que la troisième à Hong Kong (138, 139).

La voie d'infection est différente de l'hôte naturel, le porc. En effet, l'entrée de *S. suis* se produit par de petites coupures de la peau, au niveau des muqueuses de la bouche ainsi qu'au niveau de la cavité nasale (4). L'infection par l'ingestion de nourriture contaminée a aussi été proposée (140). En général, une forte exposition à *S. suis* peut conduire à une colonisation du tractus respiratoire supérieur sans produire d'effets notables sur la santé. Il a été rapporté que *S. suis* peut aussi coloniser le tractus gastro-intestinal (141). La splénectomie, l'alcoolisme et le diabète sucré ont été proposés comme facteurs de prédisposition importants pour le développement de la maladie grave causée par *S. suis* (137). La plupart des études ont montré que les souches isolées chez l'homme sont phénotypiquement et génotypiquement similaires à celles récupérées chez le porc dans une même région géographique et les propriétés de virulence semblent être similaires (4).

S. suis provoque une infection systémique chez les humains et la méningite est la manifestation clinique la plus commune. Les caractéristiques, similaires à d'autres pathogènes, comprennent divers symptômes dont les maux de tête frontaux, la fièvre et une raideur de la nuque, entre autres. Outre la méningite, l'endocardite, la cellulite, la péritonite, l'arthrite et la pneumonie sont parmi d'autres manifestations observées (137, 138, 142). Des

séquelles permanentes communes pour la méningite causée par *S. suis* sont la surdité et le dysfonctionnement vestibulaire.

En général, le traitement contre une infection à *S. suis* est basé sur l'utilisation d'antibiotiques. La pénicilline G administrée par voie intraveineuse est généralement le premier choix (2), mais d'autres antibiotiques peuvent être utilisés (l'ampicilline, les aminoglycosides et le ceftriaxone, en autres) (2, 138). De même que pour le porc, la plupart des isolats humains de *S. suis* sont résistants à la tétracycline et l'érythromycine (142). Les mesures simples de prévention, comme le port de gants lors de la transformation de la viande ou lors de l'abattage, le lavage des mains après avoir manipulé de la viande crue ainsi qu'une cuisson complète de la viande diminuent grandement les risques d'infections à *S. suis*. Les voyageurs doivent être conscients que les habitudes alimentaires dans certains pays peuvent constituer un risque pour les maladies infectieuses, y compris l'infection à *S. suis* (105).

2.3 Étapes de la pathogénèse et les facteurs de virulence associés



Figure 7. Image de *S. suis* de type 2 par microscopie électronique (143).

S. suis est un coque à Gram +, α -hémolytique, de type anaérobique facultatif (4, 113, 144). Il peut se retrouver en coque seul ou en diplocoque et, plus rarement, en de courtes chaînes. Ce pathogène se caractérise par l'absence de croissance sur gélose complémentée de 6,5% de NaCl, d'un test négatif pour Voges-Proskauer, de par la production d'acide dans un bouillon de tréhalose et de salicine ainsi que de la production de

l'amyase (145). Contrairement à GBS, moins d'études sont disponibles sur la pathogénèse de la maladie causée par *S. suis* et les facteurs de virulence impliqués.

2.3.1 Facteurs de virulence

Par manque de définition claire sur le terme 'virulence', l'identification des facteurs de virulence de *S. suis* reste difficile, puisque le concept peut différer d'un groupe de chercheurs à l'autre et selon les modèles expérimentaux d'infection (3, 146-149). La présence de certains facteurs de virulence proposée ne définit pas nécessairement que la souche est virulente. En effet, en utilisant le même modèle expérimental d'infection chez le porc, certaines souches possédant un facteur de virulence putatif se sont avérées être non virulentes, alors que d'autres souches dépourvues du même facteur étaient toujours virulentes (150, 151). Malgré tout, plusieurs facteurs de virulence peuvent être considérés importants pour la pathogénèse de l'infection à *S. suis*. En constante évolution, Fittipaldi *et al.* résumant exhaustivement les facteurs de virulence de *S. suis* proposés jusqu'à maintenant et leur effet, quoique de nouveaux facteurs sont continuellement décrits (3, 152-154). Dans le cadre de cette thèse, l'intérêt sera davantage porté sur la **CPS**. De plus, pour faciliter l'harmonisation, seuls les facteurs décrits dans les étapes de la pathogénèse seront mentionnés dans cette section. Certains facteurs sont sensiblement similaires à ceux de GBS (section 1.3.1.2) et seront donc rapidement abordés. Finalement, la pathogénèse des infections à *S. suis* de type 2 sera davantage détaillée ici, puisqu'il s'agit du type le plus décrit dans la littérature.

2.3.1.1 Capsule polysaccharidique : un facteur de virulence clé

Comme GBS, *S. suis* est une bactérie bien encapsulée (155) et il a été proposé que la CPS confère des propriétés anti-phagocytaires (18, 156). Tel que mentionné précédemment, la séparation des sérotypes de *S. suis* est basée sur les différences antigéniques dans les CPSs et 35 sérotypes (1-1/2 et 2-34) ont été décrits. L'analyse génétique du locus *cps* de tous les sérotypes de *S. suis* a montré l'existence de mécanismes potentiels pouvant expliquer la variation de la CPS (157). Par exemple, la possibilité de transferts de l'ensemble ou d'une partie de gènes du locus *cps* parmi les souches de *S. suis* ainsi que l'influence de mutations spontanées dans un seul gène ou plusieurs gènes sur l'antigénicité de certains sérotypes ont été proposées. L'accumulation

de ces transferts de gènes et de mutations à petite échelle pourrait expliquer la diversité antigénique des CPSs de *S. suis*. Contrairement à GBS, seulement deux CPSs de *S. suis*, les types 2 et 14, ont été caractérisées (16, 17). La CPS de *S. suis* de type 2 est composée de cinq sucres différents: Glc, Gal, GlcNAc, Rha et l'acide sialique (17). La CPS du type 14 diffère avec celle du type 2 par l'absence de Rha dans sa composition. Fait intéressant, la séquence acide sialique-Gal-GlcNAc-Gal des types 2 et 14 est aussi retrouvée chez la CPS des sérotypes Ia, Ib, II, III et IV de GBS (8, 17). Chez *S. suis* de types 2 et 14, l'acide sialique se trouve en position terminale en lien $\alpha 2,6$ avec le Gal adjacent, tandis que ce lien est en $\alpha 2,3$ pour GBS (16). De plus, contrairement à la CPS de GBS de type III, l'acide sialique ne semble pas être un épitope conformationnel pour les CPSs de *S. suis* de types 2 et 14 (16). Les analyses récentes basées sur le séquençage de l'opéron de synthèse de CPS prédisent la présence d'acide sialique dans les types 1, 1/2, 2, 6, 13, 14, 16 et 27 (157, 158). Cependant, une étude précédente basée sur l'agglutination de la bactérie entière avec la lectine de *Sambucus nigra*, qui est spécifique pour l'acide sialique $\alpha 2,6$, suggérerait plutôt que seulement les types 1, 1/2, 2, 14, 15 et 16 possèdent l'acide sialique (159). La figure suivante montre en exemple le locus *cps* chez *S. suis* de type 2.

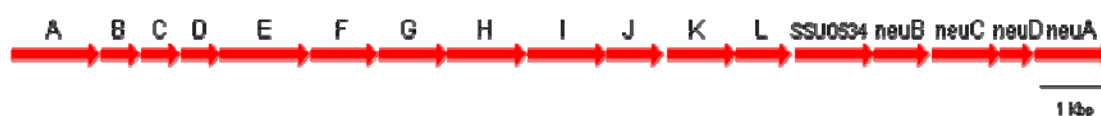


Figure 8. Version modifiée du locus *cps* de *S. suis* de type 2 .

Version modifiée de différentes références (156, 157, 160).

Chaque flèche correspond à un gène et la lettre détermine le nom du gène du locus *cps* de *S. suis* de type 2 (par exemple, *cpsA*).

En se basant sur des études avec des mutants isogéniques non encapsulées, la CPS de *S. suis* est souvent considérée comme le seul facteur de virulence important. *In vivo*, ces mutants se sont avérés être non virulents et rapidement éliminés par le système immunitaire dans des modèles d'infection chez la souris et le porc (156, 161). De plus, il est maintenant connu que la CPS module l'activation des voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la phagocytose chez les macrophages murins (162). Certaines recherches proposent également que l'épaisseur de la CPS a une corrélation positive avec la virulence, mais cette hypothèse reste controversée (113). Finalement, des facteurs autres que la CPS

seraient également critiques pour la virulence de *S. suis* puisque certaines souches non virulentes sont encapsulées (113).

2.3.1.2 Autres facteurs de virulence

Comme pour GBS, la paroi bactérienne de *S. suis* est rapportée pour favoriser sa virulence. En effet, la virulence d'un mutant isogénique pour un gène du **PGN** chez *S. suis* a été fortement atténuée par rapport à sa souche parentale dans des modèles d'infection chez la souris et le porc. Le PGN permettrait à *S. suis* de persister dans le sang et d'échapper aux mécanismes d'élimination utilisés par les neutrophiles (126). Une souche mutante déficiente en **D-ala** sur le **LTA** survit mal au contact de neutrophiles porcins et son adhérence ainsi que son invasion chez les cellules endothéliales porcines sont également atténuées (163).

La suilysine (**SLY**) est une hémolysine ou toxine cytolytique se liant au cholestérol sécrétée par différents sérotypes de *S. suis* dont le type 2 (164). La SLY a plusieurs rôles dont la cytotoxicité envers divers types cellulaires par la formation de pores transmembranaires, l'adhérence bactérienne aux cellules de l'hôte et la régulation de la réponse inflammatoire (3, 143, 165-167). Cependant, sa contribution dans la virulence de *S. suis* reste controversée (168, 169).

Différentes souches de *S. suis* expriment à leur surface des adhésines étant capables de se lier aux protéines de l'ECM. Par exemple le type 2 possède la protéine de liaison à la fibronectine (**Fbps**) et la 'glyceraldehyde-3-phosphatase deshydrogenase' (**GAPDH**). Cette dernière peut se lier à l'albumine et au plasminogène et endommager les tissus, contribuant ainsi à l'invasion bactérienne (170). Le gène de la GAPDH a été trouvé dans les isolats de types 1, 2, 7 et 9 (171). Cependant, son rôle dans la pathogénèse de *S. suis* n'est pas complètement compris puisqu'elle est présente dans des souches virulentes et non virulentes (172). L' **α -énolase**, une protéine immunogénique chez *S. suis* à la capacité de se lier à la fraction Fc des IgGs ainsi que de se lier au fibrinogène, à la fibronectine et au plasminogène (173, 174).

Les protéases bactériennes jouent un rôle essentiel dans la colonisation et l'évasion du système immunitaire de l'hôte, l'acquisition de nutriments pour la croissance et la

prolifération ainsi que des dommages aux tissus lors de l'infection (175). Plusieurs protéases ont été décrites pour *S. suis* dont la 'dipeptidyl peptidase IV' (**DppIV**) et la **SspA** (3, 176, 177). La DppIV, se liant à la fibronectine humaine, peut contribuer à la destruction des tissus et la diffusion bactérienne ainsi qu'au débalancement de la réaction inflammatoire pendant la méningite (178, 179). La SspA possède une spécificité pour le fibrinogène et des études *in vivo* chez la souris ont démontré un rôle dans la virulence lors d'une infection à *S. suis* (180, 181). Les IgAs sont importantes au niveau des muqueuses afin de protéger l'hôte contre l'adhésion de pathogènes. *S. suis* produit une protéase **IgA1** qui pourrait jouer un rôle crucial dans la pathogénèse de l'infection à *S. suis* en clivant les IgAs (182). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour prouver cette hypothèse.

Les sortases sont des enzymes qui permettent de décorer les surfaces des bactéries à Gram + avec un large éventail de protéines et favorisent une plus grande interaction des bactéries avec leur environnement avoisinant. Les sortases peuvent lier de nombreuses protéines à la surface de la bactérie en les joignant de façon covalente à la paroi (au PGN) ou elles peuvent elles-mêmes se polymériser pour construire des sous-unités de pili et favoriser l'adhérence bactérienne. Les sortases suscitent donc un vif intérêt dans le milieu scientifique puisqu'elles seraient impliquées dans la présentation à la surface bactérienne de divers facteurs de virulence (183). Cinq sortases ont été décrites pour *S. suis* de type 2 dont la **SrtA** où les protéines attachées à la paroi bactérienne peuvent se lier à la fibronectine et au collagène (184). Selon des études, SrtA serait requise pour l'adhésion, et selon la souche, essentielle pour la virulence (185, 186). Finalement, comme chez GBS, la **SodA** est présente chez des souches de *S. suis* de type 2 (3, 187). Les nucléases extracellulaires sont fréquentes chez les procaryotes et dans certains cas, ont été impliquées comme facteurs de virulence (188). Leurs substrats sont de simples ou de doubles brins d'ADN. *S. suis* exprime la **SSna**, une nucléase, dans sa paroi bactérienne (188) et un rôle protecteur contre l'effet bactéricide des neutrophiles a été observé (189).

2.3.2 Étapes de la pathogénèse

La plupart des études sur la pathogénèse des infections à *S. suis* ont été réalisées en utilisant des souches de type 2 (3). Plus précisément, pour causer la maladie, autant chez le porc que chez l'homme, *S. suis* doit rompre les barrières épithéliales, se disséminer

et survivre dans le sang, envahir les différents organes et provoquer une inflammation exagérée (3).

2.3.2.1 Colonisation: l'adhésion et l'invasion des surfaces épithéliales

Plusieurs études *in vitro* rapportent que les souches virulentes de *S. suis* peuvent adhérer à diverses lignées cellulaires épithéliales d'origine porcine et humaine (3, 143, 166, 185, 190). Les mécanismes réels utilisés par *S. suis* pour coloniser l'hôte sont plus ou moins compris. Par contre, dans le cas d'une transmission horizontale, la plupart des chercheurs croient que *S. suis* entre initialement par les voies respiratoires supérieures de l'hôte et réside dans le palatin ou les amygdales qui sont recouvertes d'un épithélium (191, 192). De plus, il peut survivre dans les amygdales de porcs sur une longue période de temps (3). Après l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales dans les amygdales, *S. suis* semblerait être en mesure de se cacher du système immunitaire. Cependant, il n'est pas clair comment *S. suis*, en très faibles quantités dans les amygdales de porcs asymptomatiques (131, 133), parviendrait à franchir cette première ligne de défense naturelle de l'hôte et déclencher une maladie. L'hypothèse la plus acceptée est que cette bactérie se déplace au niveau des voies respiratoires supérieures pour atteindre ensuite la circulation sanguine ou lymphatique (193). Chez l'humain, *S. suis* peut aussi interagir avec les cellules épithéliales à la surface de l'épiderme (lors d'une blessure de la peau) ou aux muqueuses de l'intestin (lors d'ingestion de viande contaminée) (2, 105, 166, 190).

Grâce à diverses adhésines, *S. suis* interagit avec des composants de l'ECM tels que la fibronectine, le plasminogène et le collagène (194). La **Fbps** a été démontrée pour lier la fibronectine et le fibrinogène humains *in vitro* (195), mais ne semble pas être essentielle puisqu'un mutant isogénique déficient en cette protéine a toujours la capacité de lier la fibronectine humaine (194). Chez le porc, la Fbps n'est pas nécessaire pour la colonisation des amygdales, mais il peut jouer un rôle dans la colonisation d'organes spécifiques (195). L' **α -énolase** de *S. suis*, elle, peut se lier au plasminogène, mais aussi avec une faible affinité à la fibronectine (173). De plus, la **DppIV** interagit avec la fibronectine humaine et dans un modèle d'infection chez la souris, un effet partiel sur la virulence a été démontré (179). L'adhérence à l'ECM est diminuée chez la souche mutante dépourvue de la **SrtA**, ce qui suggère que des adhésines ancrées dans le **PGN** sont également importantes pour les interactions de *S. suis* avec l'ECM (185). Finalement,

d'autres protéines ont également été identifiées comme étant des protéines favorisant l'adhésion de *S. suis* aux cellules épithéliales dont la **GAPDH** (3, 170, 196). La protéase **IgA1** est capable de cliver efficacement l'IgA1 humaine et permet plus facilement l'accès de *S. suis* aux cellules épithéliales (182). Un mutant isogénique déficient dans la production de cette protéase a causé une diminution significative de la mortalité chez le porc (197).

L'action des adhésines présentes à la surface de *S. suis* semble être entravée par la **CPS**. En effet, les souches mutantes de *S. suis* déficientes en CPS adhèrent mieux que les souches WT encapsulées autant dans des lignées porcines qu'humaines (3). De plus, nous pouvons émettre l'hypothèse que *S. suis* régule négativement l'expression de la CPS au cours des étapes initiales de l'infection en fonction des signaux environnementaux, ce qui entraîne une meilleure interaction entre les adhésines bactériennes et les récepteurs de l'hôte (198). Cette hypothèse reste à être démontrée, puisque ce n'est probablement pas le seul mécanisme impliqué (rôle du régulateur transcriptionnel RevSC21, entre autre) (199-201).

Comme mentionné précédemment, *S. suis* peut coloniser les amygdales sur une longue période de temps. Une récente étude a montré que *S. suis* est capable d'induire la production de biofilms (202), une stratégie permettant de survivre dans des conditions inhospitalières. Fait intéressant, *S. suis*, lorsque retrouvé dans les biofilms, semble réguler négativement l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse de la CPS (201). Cependant, il n'est pas connu si *S. suis* produit des biofilms dans les amygdales ou dans d'autres organes.

Bien souvent, l'invasion des cellules épithéliales peut aussi représenter le début de la dissémination systémique et l'apparition de la maladie. L'invasion des cellules épithéliales, un résultat attendu suite à l'adhésion de *S. suis* de type 2 aux cellules épithéliales, reste controversée (166, 190, 203). En effet, seules les souches non encapsulées semblent être en mesure d'envahir ces cellules (203). La destruction des cellules épithéliales est également possible puisque les souches sécrétant la **SLY** ont un pouvoir cytotoxique (193). Toutefois, les souches ne produisant pas la SLY sont également en mesure d'atteindre la circulation sanguine et de se disséminer (3). En outre, *S. suis* pourrait endommager les barrières épithéliales, se disséminer et pénétrer plusieurs tissus. La possibilité qu'il soit capable de traverser les barrières épithéliales sans causer de cytotoxicité reste à débattre,

puisque l'invasion des cellules épithéliales par endocytose médiée par un récepteur n'a été démontrée que pour des souches non encapsulées et non typables de *S. suis* (190). La figure suivante résume les mécanismes liés à l'adhésion et l'invasion cellulaire par *S. suis*.

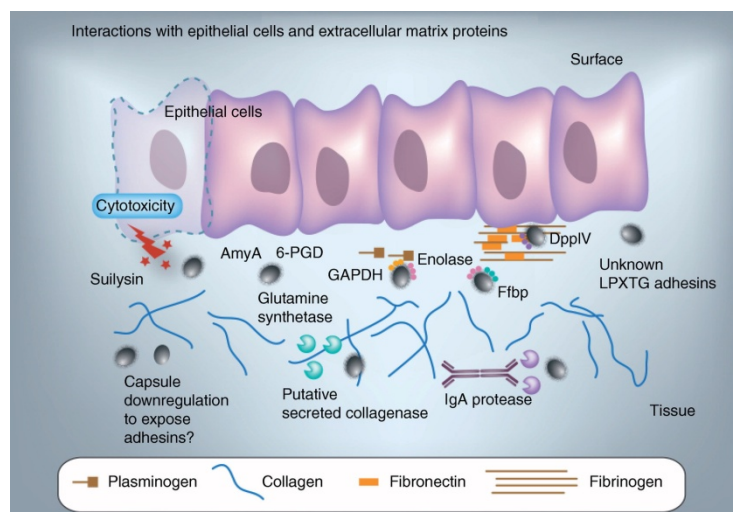


Figure 9. Mécanismes d'adhésion et d'invasion cellulaire utilisés par *S. suis*.

Fittipaldi *et al.* 2012 (3). L'adhérence de *S. suis* aux cellules épithéliales est multifactorielle. L' α -énolase, la GAPDH, la 6-PGD, l'AmyA, et la 'glutamine synthetase' sont des exemples de protéines impliquées dans l'adhésion de *S. suis*. Des adhésines avec des motif LPXTG (incluant le pili) pourraient participer à l'adhésion aux cellules épithéliales; cependant ceci reste à démontrer. L'invasion des cellules épithéliales par *S. suis* de type 2 est toujours controversée. Chez les souches qui sécrètent la suilysine, son expression peut aider à détruire l'épithélium. Les protéases détruisant les IgAs constitueraient un avantage pour *S. suis* en favorisant l'adhésion aux cellules. L' α -énolase, la 'fibronectin-fibrinogen binding protein' (Ffbp) et la 'dipeptidylpeptidase IV' (DppIV) peuvent se lier à la fibronectine et au fibrinogène. L' α -énolase peut aussi se lier au plasminogène. La régulation de la capsule peut faciliter les interactions entre les adhésines et les cellules de l'hôte.

Abbreviations : AmyA, amylopullulanase A; 6-PGD, 6-phosphogluconate dehydrogenase; DppIV, 'dipeptidylpeptidase IV'; Ffbp, 'fibronectin-fibrinogen binding protein'; GAPDH, 'glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase'.

2.3.2.2 Résistance à l'immunité innée et à l'élimination bactérienne

Suite à l'invasion ou à la rupture des cellules épithéliales, *S. suis* peut pénétrer dans la circulation sanguine et/ou les tissus et il est alors soumis à l'action des cellules phagocytaires du système immunitaire inné. En l'absence d'Abs spécifiques, *S. suis* est capable de résister à la phagocytose et à persister dans le sang à des concentrations élevées. La survie bactérienne dépend largement de la production de **CPS**, puisqu'il a été largement démontré que la CPS protège *S. suis* de l'action des neutrophiles et des monocytes (3). En effet, plusieurs études *in vitro* et *in vivo*, par l'utilisation de souches mutantes déficientes en CPS, démontrent que l'absence de la CPS corrèle fortement avec la capacité phagocytaire et l'élimination de *S. suis* par les cellules phagocytaires (156, 162, 165, 204). La CPS de *S. suis* contient l'acide sialique qui est lié à la CPS en position terminale (17). Cependant, et contrairement à GBS, au début de ce projet de thèse, le rôle de l'acide sialique dans la prévention de la déposition de la protéine C3 du complément sur la surface de *S. suis* n'était pas encore bien démontré. La CPS a également été impliquée dans l'adhésion (sans phagocytose) de *S. suis* aux monocytes, suggérant une hypothèse nommée le 'modified Trojan horse', selon laquelle cette bactérie pourrait circuler dans le sang en étant associée à la surface de cellules phagocytaires (193). Comme pour GBS, le mimétisme moléculaire a été suggéré sur la base que l'acide sialique en $\alpha 2,6$ est similaire aux épitopes largement exposés à la surface de cellules chez les mammifères (2). Ce mimétisme moléculaire pourrait conduire à l'absence de la reconnaissance d'antigènes par le système immunitaire de l'hôte, car la CPS de *S. suis* de type 2 a été rapportée pour être faiblement immunogène chez le porc (205, 206).

De part le fait que certaines souches de *S. suis* de type 2 soient virulentes sans être encapsulées indiquent que leur survie dans le sang ne repose pas uniquement sur la CPS (161). La résistance à la phagocytose est multifactorielle et des études *in vitro* et *in vivo* chez la souris et le porc démontrent l'importance de la composition du **PGN** de la paroi bactérienne, et plus particulièrement, du processus de **D-Ala** du LTA dans la survie de *S. suis* (126, 163). Une souche mutante déficiente de D-Ala dans le LTA est plus sensible à l'action des AMPs et à l'élimination par les neutrophiles porcins que la souche WT, ce qui est aussi confirmé dans des modèles d'infections murins et porcins (163). Les souches de *S. suis* sécrétant la **SLY** bénéficient de cette toxine comme un moyen additionnel pour causer la cytotoxicité des monocytes et des neutrophiles (165, 167). Par ailleurs, la SLY

semble réduire la phagocytose de *S. suis* en diminuant l'opsonisation et la capacité bactéricide des neutrophiles et des macrophages et, par conséquent, affecte l'efficacité du système immunitaire inné (165, 167). *S. suis* est également en mesure d'influencer le recrutement de neutrophiles en dégradant l'IL-8, vraisemblablement par la production d'une sérine-protéase (207). Une DNase (**Ssna**) comprise dans la paroi bactérienne de *S. suis* pourrait aussi contribuer à sa virulence en perturbant l'action de l'ADN sécrété par les neutrophiles ('neutrophil extracellular traps', NETs), ce qui a été récemment confirmé chez les neutrophiles porcins (188, 189).

Comme mentionné précédemment, la CPS de *S. suis* constitue une barrière physique contre la phagocytose. Toutefois, si internalisé (le plus souvent en très petit nombre), *S. suis* possède divers facteurs qui pourraient contribuer à favoriser sa survie intracellulaire dans les cellules phagocytaires (203). Parmi eux, la **SodA** (187), aurait un impact sur l'acidité intracellulaire et son rôle dans la virulence a été démontré *in vivo* chez la souris (208). La figure suivante résume les mécanismes reliés à la résistance de *S. suis* au système immunitaire.

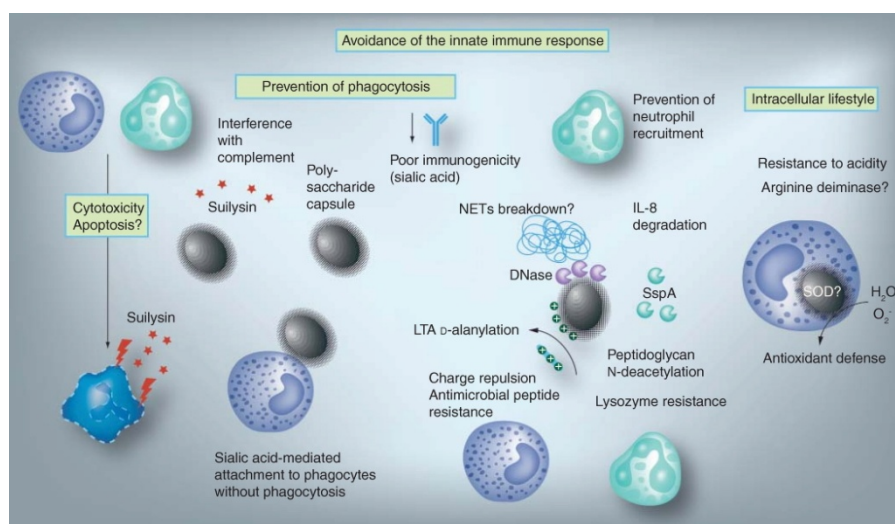


Figure 10. Résistance de *S. suis* à l'immunité innée.

Fittipaldi *et al.* 2012 (3). Il a été démontré que la CPS pourrait interférer et prévenir la phagocytose ainsi que l'élimination par les phagocytes. De plus, il est également proposé que l'attachement aux cellules puisse être régulé par l'acide sialique dans la CPS. La N-déacétylation du PGN pourrait aussi réduire l'action des neutrophiles. La D-alanylation du LTA contribuerait à la résistance aux AMPs et à l'action bactéricide des neutrophiles. Une DNase produite par *S. suis* participerait dans la résistance de l'action des NETs. La SspA, une protéase,

serait capable de dégrader l'IL-8, une chimiokine importante pour l'attraction des neutrophiles. La suilysine pourrait être toxique pour les phagocytes et interférerait dans l'action du complément. Si internalisé, *S. suis* utiliserait l'enzyme Sod et l'arginine déiminase pour résister à l'environnement intracellulaire.

Abbreviations : AMP, peptide antimicrobien; CPS, capsule polysaccharidique LTA, acide lipotéichoïque; NET, 'neutrophil extracellular traps'; PGN, peptidoglycane; SspA, 'surface-associated subtilisin-like protease'; Sod, superoxyde dismutase.

2.3.2.3 Réponse inflammatoire

En général, le but de l'activation du système immunitaire lors d'une infection microbienne est de protéger l'hôte. Le choc septique est une conséquence d'une réponse immunitaire excessive ou mal gérée par l'hôte (209). Comme en témoigne les épidémies humaines par *S. suis* en Asie causant des chocs toxiques, une libération importante de médiateurs pro-inflammatoires semble se produire pendant ces infections (2). Il a été décrit que *S. suis* est capable d'induire *in vitro* la production de cytokines pro-inflammatoires par différents types cellulaires murins, porcins et humains (162, 167, 210, 211). Ceci a été de plus confirmée *in vivo* chez la souris (212). En effet, les niveaux élevés des cytokines TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ et les chimiokines CCL2 ('chemokine ligand 2'), CCL5 et CXCL1 ('chemokine C-X-C motif ligand 1') ont été observés *in vivo* dans les 24 premières heures suite à l'infection. L'IL-10 est davantage produite suite à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, ce qui indique un mécanisme de rétroaction négative pour tenter ultimement de restreindre la réponse inflammatoire. Ces observations chez la souris peuvent s'appliquer chez le porc et l'humain, où des niveaux élevés de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires ont été détectés chez les individus présentant une infection aiguë (213, 214). Des études *in vitro* ont montré que certains récepteurs de reconnaissance, tels que le CD14 et le TLR2, pourraient être responsables de l'activation cellulaire par *S. suis*, ce qui conduirait à la libération de composants inflammatoires (167, 215, 216). Cet aspect sera davantage détaillé dans la section 3.4.

Quels sont les facteurs de virulence de *S. suis* responsables d'une telle activation inflammatoire exacerbée? La plupart des facteurs bactériens impliqués restent inconnus. Cependant, de nombreuses études avec des mutants non encapsulés de *S. suis* ont

clairement démontré que les composants de la paroi bactérienne sont les principaux facteurs d'induction de cytokines dont les lipoprotéines (151, 167, 210, 211, 217). De plus, la **CPS** semblerait contribuer à la production de CCL2 (215, 216) alors que la **SLY** activerait les phagocytes à induire la libération de cytokines pro-inflammatoires (169, 216). Un rôle similaire a été attribué récemment à la protéine 'surface-associated subtilisin-like protease' (**SspA**) chez les macrophages (180). Vanier *et al.* (213) ont suggéré que *S. suis* peut induire une libération exacerbée de médiateurs inflammatoires. Cependant, il peut aussi moduler cette réponse afin d'améliorer sa survie en dégradant activement les chimiokines et en retardant le recrutement de neutrophiles au site d'inflammation (213).

Récemment, Dang *et al.* (2014) ont démontré, par une approche transcriptionnelle chez des cellules épithéliales trachéales porcines, qu'une production exacerbée de médiateurs pro-inflammatoires lors d'un co-infection de *S. suis* avec le virus de l'influenza pourrait avoir un impact important dans la pathogénèse des maladies respiratoires causées par *S. suis*, qui serait opportuniste dans cette situation (218). La CPS jouerait aussi un rôle dans cette modulation (219).

2.3.2.4 Pénétration de la barrière hémato-encéphalique et méningite

Lorsque la septicémie ou le syndrome de choc toxique ne se produit pas, mais que le niveau de la bactériémie reste élevé, *S. suis* peut alors causer la méningite (147, 150). Comme GBS, *S. suis* doit traverser la BHE et/ou la barrière séparant le liquide céphalo-rachidien du sang (hémato-CSF) afin de provoquer des infections au SNC. L'adhésion, contrairement à l'invasion, de *S. suis* aux cellule endothéliale microvascularisée spécialisée du cerveau (BMEC)s humaines a été démontrée (220). Bien que les composants bactériens impliqués dans l'adhésion cellulaire ne soient pas bien caractérisés, la participation de la **CPS** dans ce processus est peu probable (221). Par contre, *S. suis* peut adhérer et envahir une lignée cellulaire porcine de BMECs et y survivre intracellulairement jusqu'à 7 heures, ce qui pourrait être un élément crucial pour traverser la BHE et favoriser le développement de la méningite (3, 143, 222). Cependant, cette observation ne fait pas consensus puisqu'une autre étude démontre que *S. suis* adhère aux BMECs porcines, mais n'arrive pas à les envahir (223).

Malgré que la CPS de *S. suis* interfère avec la capacité d'adhésion, des études ont réussi à caractériser davantage le processus d'invasion des BMECs porcines et l'implication d'adhésines et invasines telles que le **LTA** (163, 224), la **SrtA** (185) et l' **α -énolase** (173). Certains composants du sérum peuvent également participer aux interactions entre *S. suis* et les BMECs porcines (3). Parmi eux, seule la fibronectine a été démontrée pour jouer un rôle important (224). Quant à la **SLY**, son pouvoir cytotoxique pourrait également perturber la BHE, du moins chez les BMECs porcines. Cependant, la SLY n'était pas indispensable pour l'invasion, car un mutant déficient dans la production en SLY est apte à envahir ces cellules (143). Finalement, la SLY purifiée a la capacité d'induire la libération de plusieurs cytokines pro-inflammatoires par les BMECs porcines et humaines (3, 143, 213) ainsi que la modulation positive de molécules d'adhésion sur des monocytes humains (225).

L'autre porte d'entrée au SNC pour *S. suis* peut être la barrière hémato-CSF. Récemment, l'invasion *in vitro* et la translocation de *S. suis* à travers cette barrière ont été démontrées (226). L'invasion pourrait se faire en trois étapes soit l'invasion des cellules épithéliales des plexus choroïdes (CPEC) porcins du côté basolatéral, du transport à l'intérieur par endocytose dans des vacuoles sur le côté apical et l'exocytose sur la membrane apicale de la barrière hémato-CSF (226). De plus, *S. suis* envahit plus facilement lorsqu'il adhère à la membrane basolatérale, suggérant que l'accès direct à l'ECM est nécessaire. Comme pour la BHE, la **CPS** compromet l'invasion bactérienne chez les CPECs, et les composants de la paroi cellulaire bactérienne et/ou les protéines de surface sont nécessaires pour l'invasion (226). De plus, un modèle d'insert transwell inversé a aussi permis d'observer la translocation des neutrophiles activés par *S. suis* à travers la barrière hémato-CSF (3). *S. suis* peut également affecter l'intégrité de cette dernière, ce qui faciliterait le passage des bactéries et des leucocytes en induisant la nécrose ou l'apoptose chez les CPECs (227). En plus de la SLY, d'autres facteurs solubles peuvent également être impliqués dans la déstabilisation de la barrière hémato-CSF (3, 226).

S. suis peut induire la libération d'acide arachidonique par les BMECs, un mécanisme qui faciliterait la capacité des bactéries à pénétrer dans le SNC et de moduler l'inflammation locale (228). Il peut également moduler l'expression de molécules d'adhésion sur les monocytes humains et les cellules endothéliales, ayant comme résultante, une augmentation de l'adhésion (225, 229). D'autres études ont montré que *S. suis* est capable d'induire la libération de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines par les BMECs

humaines et porcines, la microglie et les astrocytes murins (3, 212, 230, 231). Comme indiqué précédemment, les composants bactériens responsables de la réaction inflammatoire exagérée ne sont pas encore bien connus. De plus, la CPS de *S. suis* favorise chez les macrophages humains la production de la prostaglandine E2 et de la 'matrix métalloprotéinase 9' qui peuvent également être impliquées dans la perturbation de la BHE (3).

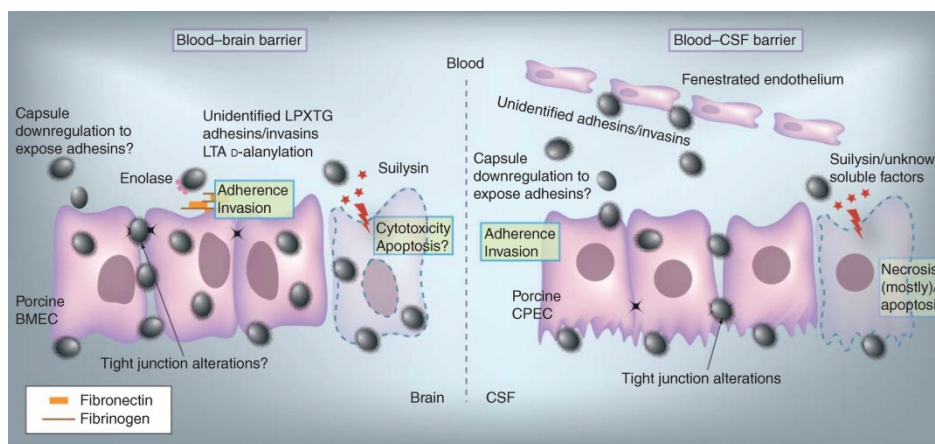


Figure 11. Invasion du système nerveux central par *S. suis*.

Fittipaldi *et al.* 2012 (3). Les deux principales portes d'entrée au système nerveux central sont la barrière hémato-encéphalique (BHE) et la barrière hémato-liquide céphalo-rachidien (CSF). Les BMECs sont les principales cellules dans la BHE. L'invasion des BMECs porcines est dépendante des adhésines/invasines et les composants de la paroi bactérienne tels que le LTA. Des protéines avec des motifs LPXTG et l' α -enolase peuvent jouer un rôle d'adhésines/invasines. L'interaction avec les protéines de la matrice extracellulaire est aussi importante. La CPS interfère partiellement avec les habiletés des adhésines/invasines, impliquant donc un mécanisme possible de régulation de la CPS. La production de suliyisine pourrait compromettre l'intégrité de la BHE grâce à son action cytotoxique. L'invasion et la translocation de *S. suis* à travers de la barrière hémato-CSF ont été démontrées et faciliteraient le trafic de *S. suis* et des leucocytes aux travers la membrane. Malgré que d'autres facteurs solubles soient impliqués, la suliyisine joue un rôle important dans le dysfonctionnement de la barrière hémato-CSF.

Abbréviations : BMEC, cellules endothéliales microvascularisées du cerveau; CEPC, cellules épithéliales des plexus choroïdes; CPS; capsule polysaccharidique; CSF, liquide céphalo-rachidien; LTA, acide lipotéichoïque

3. Réponse immunitaire innée

3.1 Composants de la réponse immune

Le système immunitaire des vertébrés est divisé en deux catégories: l'immunité innée et l'immunité adaptative. Plus particulièrement, le système immunitaire inné (SII), constitue la première ligne de défense de l'hôte contre des pathogènes et joue un rôle crucial dans leur détection rapide, et par conséquent, le déclenchement d'une réponse pro-inflammatoire (232, 233). Le SII est constitué de barrières physiques et biochimiques, de divers types de cellules qui reconnaissent les pathogènes invasifs, ainsi que de molécules secrétées. Les mécanismes physiques sont, par exemple, l'épiderme, l'épithélium respiratoire cilié, l'endothélium vasculaire et les muqueuses alors que les mécanismes biochimiques sont, eux, le pH, la température et des facteurs solubles comme le complément. Parmi les types cellulaires de l'immunité innée, se trouvent les cellules phagocytaires professionnelles (neutrophiles, monocytes/macrophages et les cellules dendritiques [DCs]) et les lymphocytes (cellules 'natural killer' [NK], cellules 'natural killer' T [NKT] et lymphocytes T $\gamma\delta$) (232, 234). Certaines cellules phagocytaires (dont les monocytes/macrophages et les DCs) sont aussi de puissantes cellules présentatrices d'antigène (APCs) et font le pont entre les immunités innées et adaptatives. Les APCs sont considérées ainsi grâce à leur capacité d'internaliser les pathogènes, d'apprêter et présenter les antigènes aux cellules T via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La réponse inflammatoire déclenchée par les cellules phagocytaires et/ou les APCs est l'une des composantes clés du SII (235).

La réponse du SII, en présence de bactéries (Figure 12), est dictée en partie par le compartiment subcellulaire qu'elles occupent. Par exemple, les bactéries extracellulaires sont soumises à la phagocytose par les cellules phagocytaires ainsi que la lyse induite par le complément. Les bactéries intracellulaires obligatoires ou facultatives (autant dans les vacuoles que dans le cytoplasme) sont soumises à l'autophagie et tuées par fusion lysosomale avec le compartiment membranaire. La détection des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) bactériens par des récepteurs extracellulaires ou intracellulaires active des cascades qui conduisent à une réponse pro-inflammatoire. La détection de PAMPs bactériens dans le cytosol déclenche également l'activation d'inflammasomes, et subséquemment, la production de cytokines pro-inflammatoires.

Dans ce projet de thèse, les efforts se sont focalisés sur les mécanismes d'endocytose/phagocytose de bactéries encapsulées extracellulaires telles que GBS et *S. suis*, ainsi que les récepteurs impliqués dans la reconnaissance de ces bactéries sur les APCs, l'activation de ces cellules (production de cytokines ou l'expression de molécules de co-stimulation) ainsi que leur effet sur d'autres cellules, dont les cellules NK.

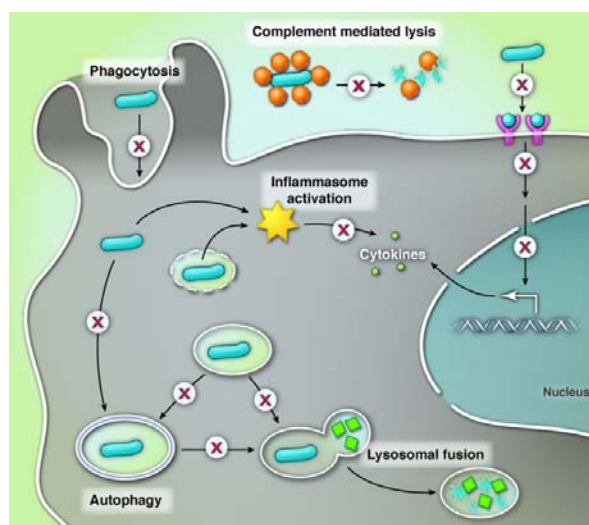


Figure 12. Réponse immunitaire innée lors d'invasion par des bactéries pathogènes (236).

Les bactéries extracellulaires sont sujettes à la phagocytose par les phagocytes professionnels et par la lyse via le complément. Les bactéries dans les vacuoles ou dans le cytoplasme (qui peuvent se retrouver dans une vacuole suite à l'autophagie) sont éliminées par la fusion lysosomale avec les vacuoles. La détection de PAMPs bactériens par des récepteurs extra- ou intra-cellulaires active des cascades signalétiques qui mènent à la production de cytokines. La détection de PAMPs dans le cytosol amène l'activation des inflammasomes, et par conséquent, la production de cytokines. Les croix rouges avec cercle correspondent aux voies que les bactéries peuvent inhiber.

3.2 Complément

Le complément représente l'une des premières lignes de défense de l'immunité innée. Le système du complément est destiné à maintenir l'homéostasie, à reconnaître et à éliminer les cellules endommagées ou modifiées ainsi que les pathogènes. Cependant, les bactéries pathogéniques peuvent contrôler et échapper à l'activation du complément. Le système du complément consiste à environ 30 à 50 protéines qui circulent dans les fluides

corporels et le plasma ou sont présents à la surface de cellules endogènes, de membranes biologiques et de tissus. De façon générale, les composants sont groupés en précurseurs inactifs, en effecteurs suite à l'activation des précurseurs, en régulateurs et finalement en inhibiteurs (237). L'activation du complément provoque une puissante boucle d'amplification permettant la formation de plusieurs peptides qui améliorent les fonctions effectrices du complément. Les molécules régulatrices veillent à ce que la cascade soit correctement activée et contrôlée et que les actions des peptides effecteurs se produisent au bon moment et au bon emplacement (238). En effet, les molécules régulatrices peuvent efficacement bloquer l'activation et la progression de la cascade en présence d'antigènes du soi.

Le complément est activé via trois principales voies (237). La voie alternative est initiée par contact avec une surface cellulaire étrangère à l'hôte, dont les bactéries. La voie classique est induite par des immunoglobulines (Igs) liées à l'antigène correspondant mais également par des molécules du soi endogènes dont la protéine C réactive, l'amyloïde P sérique et la pentraxine 3. La voie des lectines est induite par des structures d'hydrates de carbone spécifiques qui sont présentes à la surface de cellules étrangères ou modifiées, dont les bactéries. Dans le cadre de ce projet de thèse, le rôle du complément n'a pas été abordé et ne fera pas l'objet d'une description détaillée (Pour de plus amples informations, Zipfel *et al.* décrivent très bien les voies du complément ainsi que les façons dont les pathogènes contournent ces voies (237-239)).

Comme mentionné précédemment dans les sections 1.3.1 et 2.3.1, GBS et *S. suis* sont aptes à bloquer la voie du complément, particulièrement la voie alterne, en s'associant principalement à des facteurs inhibiteurs, dont le facteur H, pour bloquer l'action des C3 et C5 convertases.

3.3 Voies d'internalisation des bactéries

Les mécanismes d'internalisation peuvent se séparer en deux grandes catégories : la phagocytose et l'endocytose (240). La phagocytose touche plus particulièrement les phagocytes professionnels alors que l'endocytose est un processus commun à toutes les cellules, excepté les globules rouges (Figure 13). Une vaste gamme de protéines sont impliquées dans les divers mécanismes d'internalisation et sont divisées en grande partie selon leur présence ou leur absence dans ces différentes voies. La phagocytose et la

macropinocytose impliquent la formation de grandes vacuoles membraneuses qui peuvent atteindre plusieurs microns de diamètre. Pour toute voie d'endocytose, une structure de bourgeonnement de la membrane plasmique est une condition au préalable et les petites invaginations résultantes sont de 100 à 200 nm de diamètre de formes vésiculaire, sphérique ou tubulaire. La dynamine est l'une des protéines clés responsables de la scission de la vésicule (241). Après la scission, les petites vésicules fusionnent généralement avec un compartiment commun, l'endosome précoce.

La composition lipidique de la membrane cellulaire, dont la présence ou non de radeaux lipidiques (ou 'lipid rafts'), influence le type d'internalisation. Par exemple, la voie d'endocytose dépendante de la clathrine (CME) est indépendante des radeaux lipidiques alors que la phagocytose et la macropinocytose impliquent des domaines avec ou sans radeaux lipidiques. En ce qui a trait aux voies d'endocytose indépendantes de la clathrine, la majorité de ces voies ont lieu en présence de radeaux lipidiques (242).

Dans le cadre de mon projet de doctorat, nous nous sommes davantage intéressés aux voies de la phagocytose, de l'endocytose dépendante de la clathrine ou de la cavéole ainsi que des radeaux lipidiques.

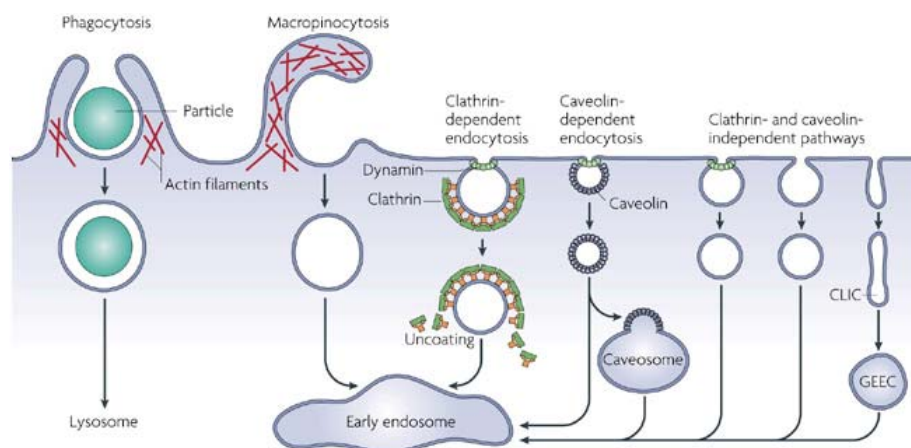


Figure 13. Voies d'internalisation dans les cellules (243).

Les grosses particules sont internalisées par phagocytose et les particules fluides par macropinocytose. De nombreuses molécules sont endocytées par des mécanismes qui sont indépendants de la clathrine et de la dynamine. Plusieurs molécules se retrouvent dans l'endosome précoce via des vésicules (vésicules enrobées de clathrines ou de cavéolines) ou par des tubules intermédiaires connus comme 'clathrin- and dynamin-independent carriers'

(CLICs) qui sont dérivées de la membrane cellulaire. Certaines voies impliquent le trafic de compartiments intermédiaires, comme les cavéosomes ou des 'glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein-enriched early endosomal compartments' (GEEC), qui prennent la route vers les endosomes.

3.3.1 Phagocytose

Le processus de phagocytose est restreint à un nombre limité de cellules dont les DCs, les monocytes/macrophages et les neutrophiles. Le but principal est d'éliminer les grosses particules de plus de 0,5 μm , en particulier des pathogènes ou des débris cellulaires (242). Sous certaines conditions, ce mécanisme peut être retrouvé chez les fibroblastes, les cellules endothéliales ou les cellules épithéliales (242). À l'heure actuelle, le rôle exact de la dynamine dans la phagocytose, davantage attribué à l'endocytose, n'est pas encore bien déterminé. En effet, l'absence de la dynamine bloquerait l'extension de la membrane des macrophages et empêcherait l'expansion maximale autour de la particule/pathogène (244, 245). Par contre, il est clairement démontré que la phagocytose implique les GTPases dont Rac1 et Cdc42 de la famille Rho ainsi que l'implication de plusieurs autres molécules qui sont activées par des récepteurs spécifiques à la surface cellulaire et qui induisent une cascade d'évènements intracellulaires menant à la polymérisation et la dépolymérisation de l'actine (240, 246). Parmi ces autres protéines, on retrouve les kinases de la famille Src, les protéines qui modifient les lipides membranaires PI3K et phospholipase C ainsi que le facteur nucléaire Arp2/3 (247, 248). Par exemple, lorsque le récepteur Fc sur les macrophages reconnaît la portion Fc des Abs liés à des antigènes sur des bactéries, une série d'évènements enclenchent l'activation de Cdc42 et de Rac1 de la famille Rho pour favoriser l'assemblage de l'actine et la formation d'extensions cellulaires, appelées pseudopodes, qui finissent par se prolonger autour de la bactérie liée aux Abs et de l'envelopper complètement. Les vésicules résultantes, appelées phagosomes, sont façonnées selon la forme des particules internalisées. Il pourrait y avoir un échange de matériel entre les endosomes précoces, les endosomes 'recyclés' et les phagosomes. Finalement, la formation du 'phagolysosome' (fusion du phagosome avec le lysosome) permet le traitement digestif de son contenu via le déversement de divers enzymes spécifiques (242, 247). Cependant, chez les DCs, cette digestion est partielle pour permettre une meilleure présentation des peptides antigéniques par les molécules du CMH de classe II. La phagocytose active la production des cytokines pro-inflammatoires et des

chimiokines qui permettront d'orchestrer les réponses inflammatoires locales et systémiques et de diriger ainsi le développement de l'immunité adaptative. Il est important de souligner ici que les réponses inflammatoires ne sont pas uniquement dépendantes de l'internalisation du pathogène et peuvent être engagées simplement par certains récepteurs à la surface des cellules phagocytaires (248).

Différents récepteurs sont reconnus pour participer à la phagocytose (Tableau III). Parmi ces récepteurs, certains sont dépendants de l'opsonisation par des Abs (récepteurs Fc), par le complément (récepteurs du complément [CR]) ou par des composants du sérum (intégrine $\alpha 5\beta 1$) alors que d'autres sont indépendants de l'opsonisation (Dectin-1, 'scavenger receptor A' [SRA], TLRs, en autres) (248). Plusieurs de ces récepteurs ont été rapportés pour se retrouver dans des radeaux lipidiques, mais les radeaux lipidiques ne seraient pas une partie intégrante des phagosomes (248). En effet, ils enrichiraient plutôt initialement les pseudopodes entourant la bactérie. Au final, la phagocytose est un processus dynamique et diversifié avec de nombreux sites potentiels pour sa régulation.

Tableau III. Récepteurs impliqués dans la phagocytose.

Type de phagocytose	Récepteurs	Ligands
Dépendante de l'opsonisation	Récepteurs Fc (FcγRI, FcγRIIA and FcγRIIA)	Portion Fc des anticorps liés à des molécules
	Récepteurs du complément (CR1, CR3 et CR4)	Composants du complément liées à des molécules
	Intégrine $\alpha 5\beta 1$	Fibronectine liée à des molécules
	CD14	Bactérie (lipopolysaccharide)
Indépendante de l'opsonisation	Dectin-1	β -glucane
	Récepteur mannose	Mannane
	Récepteur de macrophages MARCO	Bactérie (ligand spécifique non déterminé)
	'Scavenger receptor A'	Bactérie (plusieurs ligands)
	Intégrine $\alpha V\beta 5$	Cellules apoptotiques
	Récepteurs de type Toll (TLRs)	Variés, incluant les lipopolysaccharides et les lipopeptides

Version adaptée de Flannagan *et al.* 2012 ainsi que d'Underhill *et al.* 2012 (247, 248)

3.3.2 Endocytose dépendante de la clathrine (CME)

La CME est la voie d'endocytose la plus largement caractérisée. En raison de sa capacité à déclencher une internalisation lors de la liaison ligand-récepteur, la CME est également souvent désignée sous le nom d' 'endocytose médiée par le récepteur'. Cette voie comprend l'internalisation d'antigènes, de nutriments, de facteurs de croissance et de récepteurs. Ce mécanisme est retrouvé chez la plupart des cellules. Il amène le développement de 'clathrin-coated pits' (CCP), et subséquemment, la formation de 'clathrin-coated vesicles' (CCV). La protéine centrale dans cette voie est la clathrine (249). Le facteur de croissance épidermique et la transferrine sont quelques-unes des molécules les plus connues et bien étudiées pour utiliser la CME. Suite à un signal par certains récepteurs transmembranaires, ceux-ci, ainsi que leurs ligands, conduisent la formation d'une zone invaginée avec des protéines appelées clathrines. L'attraction de la clathrine à la membrane permet la création de CCPs sous un processus d'invagination qui requiert différentes protéines adaptatrices et accessoires. Il existe environ 20 différentes protéines associées à la clathrine pour engager la CME dont la protéine AP-2, des epsins et la dynamine (241). Par exemple, l'AP-2 stabilise la formation de CCPs à la membrane plasmique. La diversité des protéines reflète l'adaptation de la cellule selon les molécules à être internalisées. Les protéines adaptatrices et accessoires coordonnent la nucléation de la clathrine sur les sites de la membrane plasmique qui sont destinés à être internalisés (249). Cette étape favorise la polymérisation de la clathrine en treillis incurvés (formation d'un 'manteau' de clathrines), ce qui stabilise la déformation de la membrane attachée vers l'intérieur. La polymérisation de la clathrine (couplée avec l'action d'autres protéines) facilite la formation et la constriction du col de la vésicule à la membrane cellulaire. La dynamine, une protéine membranaire GTPase, forme un polymère en hélice autour de ce col rétréci et, lors de l'hydrolyse du GTP, favorise la scission de la vésicule de la membrane plasmique (250), libérant de manière irréversible la CCV à l'intérieur de la cellule. Dans le cytosol, la CCV commence à perdre son 'manteau' de clathrines, avec l'aide de protéines dont l'auxiline et la hsc70, qui est ensuite recyclé avec d'autres protéines adaptatrices et accessoires pour leur réutilisation. Cette vésicule dénudée subira alors quelques étapes supplémentaires avant sa fusion dans le compartiment intracellulaire désiré, c'est-à-dire, l'endosome précoce. L'acidification à l'intérieur de l'endosome (et par conséquent, la fusion avec le lysosome) dicte le tri des molécules selon les besoins de la cellule (Figure 14).

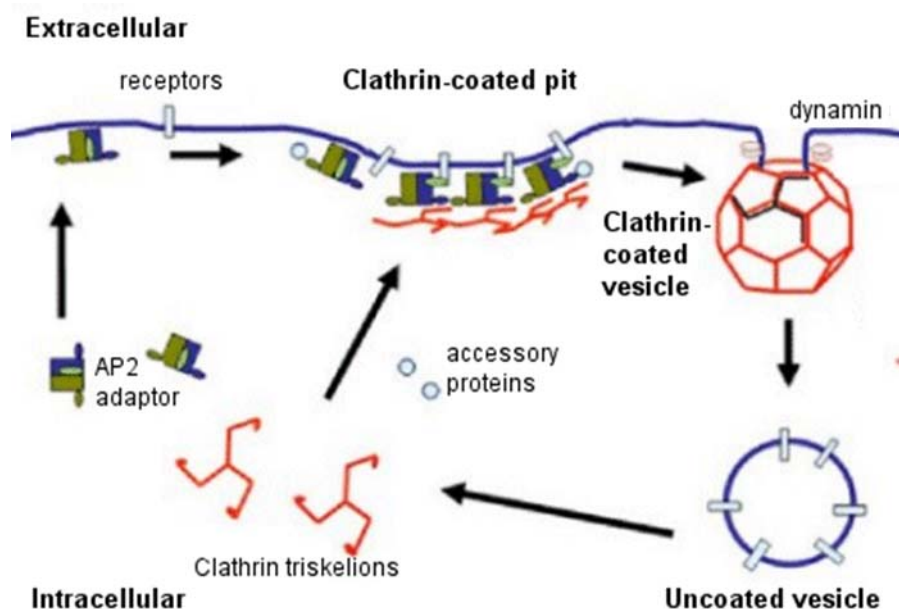


Figure 14. Aperçu des principaux événements de l'endocytose dépendante de la clathrine

Image provenant du Dr. Tony Jackson (Department of Biochemistry, University of Cambridge) (251).

3.3.3 Endocytose dépendante des cavéoles

Les cavéoles ou 'petites cavernes' sont des invaginations de la membrane plasmique en forme de ballons de 60 à 80 nm de diamètre qui sont morphologiquement distinctes des CCPs au niveau structural (252). Elles sont présentes à la surface cellulaire de plusieurs cellules dont les leucocytes, les cellules musculaires, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les adipocytes (253). Elles contiennent une membrane composée de cholestérol et de glycolipides et sont bordées de protéines nommées cavéolines (CAV) qui stabilisent les microdomaines de glycolipides et de cholestérol (241). Il existe trois isoformes différentes des cavéolines: CAV-1, CAV-2, et CAV-3. Bien que CAV-1 et CAV-2 sont co-exprimées dans les cavéoles, CAV-1 est l'isoforme dominante et le plus abondant dans ces structures (252). La CAV-1 se lie au cholestérol dans les radeaux lipidiques. L'absence de cavéoles a été démontrée chez des souris déficientes pour le gène de la CAV-1 (254). La CAV-1 est oligomérisée dans le réticulum endoplasmique et est ensuite transférée à l'appareil de Golgi pour l'inclusion de cholestérol. Elle est ensuite transportée vers la membrane plasmique dans de petites vésicules qui fusionnent avec le feuillet interne de la

membrane plasmatique suivi par le recrutement d'autres lipides et de protéines telles que les protéines 'cavines' (242). La CAV-1 joue un rôle important dans la régulation d'un large éventail de signaux de transduction tels que la signalisation via l' 'extracellular signal-regulated kinase' (Erk), PI3K et Rac (255). Les cavéoles finissent par se détacher de la membrane plasmatique grâce à la scission dépendante de la dynamine puis forme des vacuoles nommées cavéosomes (256). Ces cavéosomes, qui seraient des vésicules neutres, contourneraient la voie des endosomes et transfèreraient leur contenu directement au réticulum endoplasmique (257). Cependant, Hayer *et al.* suggèrent plutôt que les cavéosomes sont un stade de maturation des endosomes dans lequel l'accumulation de la CAV-1 est en attente de dégradation (258) et propose que le terme cavéosome ne soit pas utilisé (Figure 15).

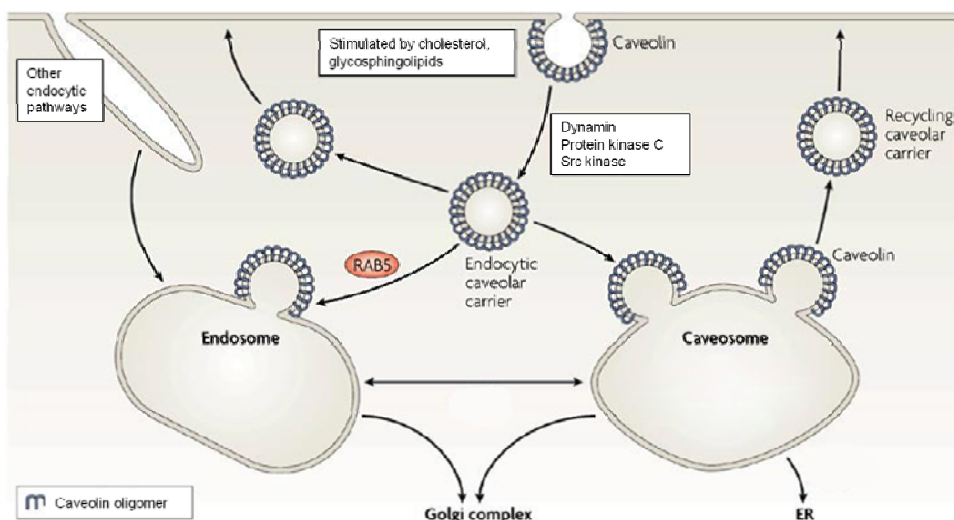


Figure 15. Voie d'endocytose dépendante des cavéoles.

La voie des cavéoles est régulée par les cavéolines, les radeaux lipidiques, la dynamine, la protéine kinase C et les kinases Src (252). Les cavéoles formées peuvent fusionner directement avec les endosomes précoces ou les cavéosomes ou même retourner à la membrane cellulaire sans implication des vésicules endosomales intermédiaires. Les molécules endocytées peuvent ensuite être transportées vers le réticulum endoplasmique et les composants des cavéoles, dont les cavéolines, peuvent être recyclés et retournés à la membrane cellulaire.

3.3.4 Endocytose dépendante des radeaux lipidiques (indépendante de la clathrine et de la cavéoline)

La membrane cellulaire a longtemps été décrite comme une membrane mosaïque fluide constituée d'une bicouche lipidique uniforme parsemée de protéines flottantes de manière aléatoire (259). Aujourd'hui, nous savons que la membrane cellulaire n'est pas uniforme et contient plutôt des régions lipidiques bien ordonnées à travers un environnement membranaire lipidique désordonné. Ces groupes sont maintenant appelés radeaux lipidiques ('lipid rafts'). Les radeaux lipidiques sont petits (10-200 nm) et hétérogènes avec des domaines dynamiques très riches en cholestérol, en sphingolipides, en gangliosides et en 'glycosylphosphatidylinositol anchors' (GPI-AP) (260, 261). La Figure 16 montre comment les sphingolipides avec de longues chaînes hydrocarbonées et insaturées forment les radeaux avec le cholestérol. Comme les cavéoles, les radeaux lipidiques sont également enrichis en glycosphingolipide GM1. Par conséquent, ces deux voies partagent des compositions protéiques et lipidiques similaires. Toutefois, les radeaux lipidiques n'ont pas les cavéolines. Ces radeaux comprennent des protéines fixées à des GPI-APs qui sont insérées dans le feuillet externe de la membrane cellulaire, des protéines fixées sur le feuillet interne de la membrane cellulaire ainsi que des protéines transmembranaires qui ont un domaine cytoplasmique en plus d'un domaine externe qui est exposé à la surface cellulaire. Ces radeaux jouent un rôle dans la signalisation cellulaire, le trafic membranaire et l'endocytose (242). L'utilisation de la dynamine par les radeaux lipidiques pour favoriser la scission des vésicules est controversée selon la voie décrite.

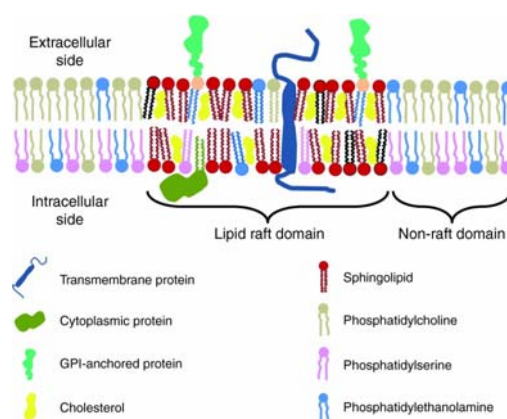


Figure 16. Représentation schématique des radeaux lipidiques.

La membrane de la cellule contient des groupes de radeaux lipidiques qui existent à l'intérieur des régions sans radeaux lipidiques, un milieu généralement désordonné (242). Les radeaux

lipidiques sont petits (10–200 nm), hétérogènes et hautement dynamiques. Les sphingolipides sont de longues chaînes d'hydrocarbures insaturées à travers ces domaines. De plus, dans les radeaux se retrouvent : (i) des protéines attachées au 'glycosylphosphatidylinositol anchors' (GPI-AP) qui sont insérées dans le feuillet externe de la membrane, (ii) des protéines attachées au feuillet interne de la membrane et (iii) des protéines transmembranaires qui ont un domaine cytoplasmique en plus d'une domaine extracellulaire.

Plusieurs voies d'endocytose sont dépendantes des radeaux lipidiques mais indépendantes des cavéolines et aussi indépendantes de la clathrine. Ces différentes voies ne seront pas approfondies dans cette thèse, mais notons la voie dépendante à la protéine flotilline, la voie dépendante de Graf1, la voie dépendante d'Arf6 et la voie dépendante de RhoA. Les vésicules résultantes vont de 50 à 100 nm de diamètre selon la voie et, subséquemment, évoluent pour devenir des endosomes tardifs et fusionner avec les lysosomes. La Figure 17 montre ces différentes voies et les protéines régulatrices impliquées.

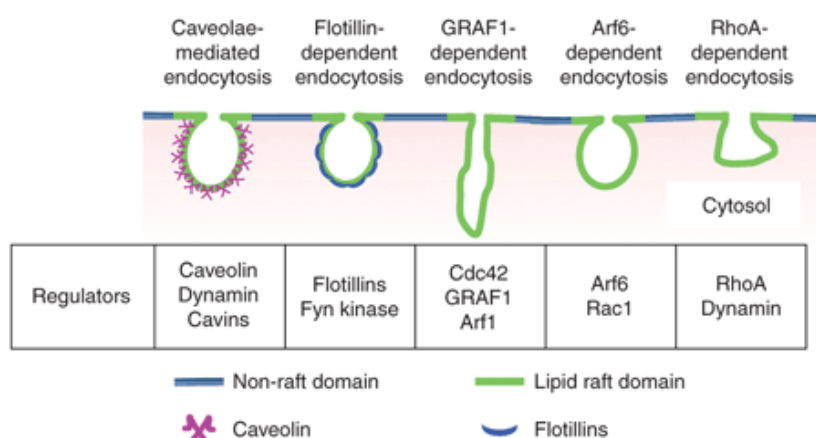


Figure 17. Représentation schématique des voies d'endocytose qui ont lieu dans les domaines de radeaux lipidiques de la membrane cellulaire et certains de leurs régulateurs clés (242).

L'endocytose dépendante des cavéoles prend place dans les radeaux lipidiques qui sont enrichis de cavéolines et les vésicules résultantes sont stabilisées par la cavine. La scission des vésicules se fait via l'action de la dynamine. Similairement, la voie dépendante de la flotilline résulte de la formation rapide de vésicules enrichies de flotillines suite à la phosphorylation de ces dernières par les kinases Fyn. La voie dépendante de Graf1 est régulée par l'action complémentaire de Cdc42 et Arf1 dans la modulation de la polymérisation de l'actine. L'actine et Graf1 permettent alors la formation de vésicules endocytiques. Similairement, Arf6 régule la

formation de la voie dépendante d'Arf6 et Rac1 joue un rôle dans la scission des vésicules. La voie d'endocytose dépendante de RhoA est formée via RhoA et l'actine et les vésicules sont détachées de la membrane plasmique grâce à l'action de la dynamine.

3.3.5 Mécanismes d'évasion bactérienne

Caractériser les mécanismes qu'exploitent les pathogènes pour envahir les cellules et provoquer la maladie chez l'hôte est crucial pour comprendre leur pathogénèse. Les pathogènes utilisent les voies normales de l'internalisation de particules pour permettre leur entrée intracellulaire. Un certain nombre d'études a rapporté que les bactéries pathogènes sont susceptibles d'exploiter la CME pour envahir les cellules non-phagocytaires. *Listeria monocytogenes*, une bactérie à Gram +, utilise la CME et déclenche son internalisation par l'interaction des protéines membranaire internaline (Inl) A et InlB avec les récepteurs E-cadhérine et Met, respectivement, chez les cellules de l'hôte (241, 262). L'utilisation de la CME par *L. monocytogenes* corrèle aussi avec sa capacité pathogénique chez l'hôte (263, 264). Bien que *Staphylococcus aureus* emprunterait aussi cette voie pour son internalisation, sa co-localisation avec la clathrine n'a pas encore été démontrée (265). Récemment, de multiples mécanismes ont été impliqués dans l'endocytose de *S. pneumoniae* par les cellules endothéliales dont les voies dépendantes de la clathrine et des cavéoles (266). L'endocytose dépendante des cavéoles a été démontré pour *S. pyogenes* et *Streptococcus ubéris* chez les cellules épithéliales et endothéliales (267, 268). Par contre, chez les macrophages, l'internalisation de *S. pyogenes* semble être indépendante de la dynamine (269).

Un rôle de la CME chez les bactéries à Gram -, comme *Chlamydia trachomatis*, a aussi été démontré chez des cellules épithéliales alors que la voie dépendante des cavéoles n'est pas essentielle (241, 270). Des observations similaires ont été remarquées avec *Neisseria gonorrhoeae* où la clathrine colocalise avec ce pathogène à l'entrée de cellules épithéliales humaines de l'urètre (271). Chez *Escherichia coli* uropathogène (UPEC), le type cellulaire semble influencer l'utilisation de voies d'endocytose. Par exemple, chez les macrophages, l'internalisation serait dépendante des radeaux lipidiques ainsi que des cavéoles alors que chez les cellules épithéliales de la vessie, cela serait exclusivement par la CME puisque que l'inhibition de la cavéoline et du cholestérol n'a pas d'effets significatifs sur l'invasion (272-274). Le processus d'invasion via la CME par *E. coli* nécessite de

nombreuses protéines accessoires classiques, y compris l'AP-2 et l'epsin (274). *E. coli* entéropathogène (EPEC) exploite également des mécanismes d'endocytose dans le cadre de son processus infectieux. L'une des caractéristiques des infections aux EPECs est l'établissement d'une structure riche en actine formant un piédestal ainsi que le recrutement de la clathrine et de la dynamine (241, 264, 275). Dans le cas de *Campylobacter jejuni*, son internalisation impliquerait la voie des cavéoles chez les cellules épithéliales (241, 276, 277). L'utilisation de cellules épithéliales pulmonaires ainsi que de souris déficientes pour le gène CAV-1 ont démontré une diminution de l'infection face à *Pseudomonas aeruginosa* et donc une implication des cavéoles (278-280). Cependant, il semblerait plutôt que ce soit la CAV-2 qui soit impliquée dans ce processus. En effet, il est connu que CAV-1 est nécessaire à l'expression de CAV-2 à la surface cellulaire (281). Il a donc été suggéré que *P. aeruginosa* envahirait les cellules de l'hôte par une voie dépendante des cavéoles et nécessitant la présence de CAV-2 pour réguler les radeaux lipidiques. D'autres études sur l'internalisation par des radeaux lipidiques, mais indépendante de la clathrine et des cavéoles ont été effectuées chez d'autres pathogènes (241). Voici un tableau récapitulatif des observations.

Tableau IV. Résumé des mécanismes exploités chez les bactéries pour leur internalisation

Voie d'endocytose	Bactéries
Dépendante de la clathrine (et dépendante de la dynamine)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>EPEC</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhea</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>
Dépendante des cavéoles (et dépendante de la dynamine)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>UPEC</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>
Dépendante des radeaux lipidiques (cholestérol) (Indépendante de la dynamine)	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i>

Abbreviations: EPEC, *E. coli* entéropathogène; UPEC, *E. coli* uréthropathogène

3.3.6 Mécanismes d'internalisation utilisés par GBS et par *S. suis*

Au début de ce projet de thèse, peu d'informations étaient disponibles sur les voies d'endocytose utilisées par GBS pour son internalisation chez les cellules de l'hôte, encore moins au niveau des cellules phagocytaires. Cependant, il est démontré que GBS a la capacité d'envahir divers types cellulaires dont les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les macrophages et que la polymérisation de l'actine est cruciale dans ce processus (18, 32, 46, 71, 94, 102, 282-284). D'un point de vue moléculaire, GBS active de nombreuses protéines pour le réarrangement du cytosquelette et permet ainsi son internalisation. En effet, lors d'une infection de cellules épithéliales avec GBS, une augmentation des niveaux d'activation de RhoA, Rac1 et Cdc42 est observée (285). Plus particulièrement, Rac1 et l'intégrine $\beta 1$ sont impliquées dans la phagocytose de GBS chez les macrophages et la subséquente maturation des phagosomes (286). La voie d'activation par PI3K/Akt est une voie de signalisation impliquée dans le réarrangement de l'actine chez les cellules de l'hôte infectées à GBS (287). La CPS de GBS semble peu influencer la capacité d'internalisation de GBS puisqu'un mutant non encapsulé est internalisé à des mêmes niveaux que sa souche WT de GBS de type III encapsulée chez les macrophages murins (18). Golusko *et al.* en 2008 ont démontré pour la première fois la mobilisation de radeaux lipidiques pendant l'invasion de GBS chez des cellules épithéliales de l'endomètre (288). De plus, une étude préliminaire a suggéré l'endocytose médiée par un récepteur chez les macrophages en contact avec GBS de type III par un mécanisme partiellement dépendant de la formation de CCPs et la mobilisation d'un réseau de microtubulines (94).

Contrairement à GBS, pour *S. suis*, il a été démontré très clairement que cette bactérie encapsulée contourne son internalisation chez diverses cellules dont les monocytes, les macrophages, les cellules de la microglie et les neutrophiles autant d'origines murine, porcine qu'humaine (3, 162, 165, 166). Il est vrai que la CPS sialylée de *S. suis* permet son attachement sur les phagocytes, mais cette liaison n'enclenche pas de mécanismes de signalisation menant à l'internalisation chez ces cellules (167). Des travaux précédents chez les macrophages ont observé de hauts niveaux de phosphorylation d'Akt et de la protéine kinase C (PKC) suite à une infection avec un mutant non encapsulé de *S. suis* de type 2, alors que la souche WT montrait plutôt une réduction de l'activation de la voie de signalisation PI3K-Akt-PKC (162). De plus, la phosphorylation de la MAPK p38 est également altérée en présence de la CPS lors d'infection des cellules de la microglie avec

S. suis de type 2 (231). La composition de la CPS de *S. suis* de type 2 pourrait avoir un impact négatif sur la mobilité de la membrane plasmique puisqu'il a été démontré que les macrophages pré-traités avec la CPS de *S. suis* de type 2 sont moins aptes à l'internalisation de GBS de type III (162). Le mécanisme de cette inhibition n'était pas bien compris au début de ce projet de thèse. L'internalisation de *S. suis* par les cellules épithéliales porcines au cerveau, malgré un faible niveau, est dépendante de l'actine et indépendante des microtubulines (143, 226).

3.4 Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

La réponse du SII n'est pas totalement non spécifique, puisqu'elle est capable de discriminer entre le soi et une variété de pathogènes. La réponse du SII est activée au moyen d'un nombre limité de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) qui peuvent être exprimées à la surface cellulaire, dans des compartiments intracellulaires ou sécrétés. Les principales fonctions des PRRs comprennent l'opsonisation, l'activation du complément et la cascade de la coagulation, la phagocytose, l'induction de l'apoptose et l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires (232, 235, 289). Ces PRRs visent à reconnaître, par exemple, des PAMPs bactériens tels que le lipopolysaccharide (LPS), les lipoprotéines, le LTA, le PGN, des oligosaccharides, entre autres (235, 289). Les PAMPs sont générés par les pathogènes et non par l'hôte, ce qui suggère que les PAMPs sont de bonnes cibles pour l'immunité innée et pour faire la distinction entre le soi et le non-soi (289). Parmi les PRRs, les TLRs et les 'nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptor' (NLR) ont été mis en évidence comme des récepteurs importants du SII (235, 289).

En plus de la reconnaissance des PAMPs, il a été suggéré que le système immunitaire réagit à d'autres signaux associés à l'infection. Plus particulièrement, il a été proposé que les cellules nécrotiques ou apoptotiques sont susceptibles de libérer des molécules telles que l'ADN, l'ATP, l'acide urique et des protéines liées à l'ADN dans le milieu extracellulaire (290). Ces molécules dérivées de l'hôte, nommées 'motifs moléculaires associées aux dommages cellulaires' (DAMPs), peuvent stimuler des réponses immunitaires, et ce, en absence d'infection (lors de traumatisme, ischémie, cancer, entre autres) (291). Cependant, il n'est pas clair si les DAMPs jouent un rôle important dans la réponse de l'hôte en présence de pathogènes. En effet, la plupart des dommages qui se

produisent lors d'une infection peut être due à la réponse de l'hôte plutôt que reliée à l'action directe du pathogène. Ces dommages infligés par l'hôte peuvent amplifier les réponses immunitaires, mais de nombreux pathogènes semblent plutôt éviter d'endommager l'hôte. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes davantage intéressés aux interactions entre les PAMPs et les récepteurs sur les DCs.

3.4.1 Voie des récepteurs de type Toll (TLR)

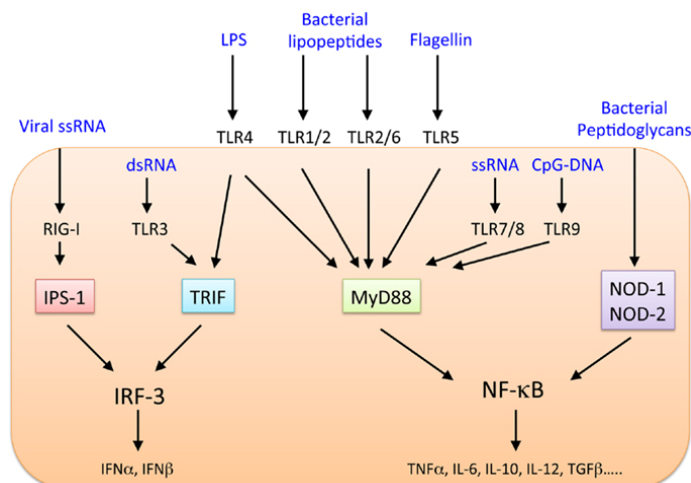


Figure 18. Récepteurs de type Toll et leurs voies de signalisation (292).

Abbreviations : IPS-3, 'interferon-beta promoter stimulator 1'; IRF3, 'interferon regulatory factor 3'; LPS, lipopolysaccharide; MyD88, 'Myeloid differentiation primary response gene 88'; NF-κB, facteur nucléaire κB; NOD, 'Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein'; TLR, récepteur de type Toll; TRIF, 'TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β'.

La famille des TLRs, récepteurs localisés à la surface extracellulaire ou à l'intérieur d'endosomes (intracellulaire), est la classe la plus importante et la plus largement étudiée des PRRs (234, 293). Structuellement, les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I avec des ectodomains contenant des 'leucine-rich repeat' (LRR) qui interviennent dans la reconnaissance des PAMPs, des domaines transmembranaires ainsi que le domaine intracellulaire 'Toll/interleukin-1 receptor' (TIR) requis pour la transduction du signal en aval. La famille des TLRs se compose désormais de 13 membres chez les mammifères (234, 289). À ce jour, 10 TLRs ont été identifiés chez l'homme tandis que chez la souris, 12 ont été reconnus (294). Les TLRs sont distribués de manière différente à l'intérieur de la cellule. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 sont exprimés à la surface cellulaire alors que TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 se retrouvent exprimés dans des compartiments intracellulaires tels que les endosomes (235, 295). Chaque TLR reconnaît des PAMPs distincts dérivés de

divers pathogènes, notamment les virus, les bactéries, les champignons et les protozoaires (voir Tableau V) (235, 295). En plus de la reconnaissance de PAMPs, les TLRs peuvent également être en mesure de reconnaître des signaux endogènes, tels que les protéines de choc thermique et les produits de cellules nécrotiques, et peuvent donc être impliqués dans l'activation de la réparation tissulaire ou dans les réactions auto-immunes (289). Dans le cadre de cette thèse, un intérêt plus soutenu au TLR2 (chez la souris) a été apporté.

Tableau V. TLRs reconnaissent divers motifs moléculaires associés aux pathogènes dont les bactéries, les champignons, les protozoaires et les virus.

TLR	Ligand
TLR1	Triacyl lipopeptides (bactérie)
TLR2	PG, LTA (bactérie Gram +), lipoprotéines, lipopeptides, lipoarabinomannane (mycobactéries) Zymosan, phospholipomannane (champignons) GPI anchor (protozoaires) Protéines de l'enveloppe (virus)
TLR3	Poly (I :C), dsRNA (virus)
TLR4	LPS (Bactérie Gram -) Protéine de fusion RSV (virus) Glycoinositolphospholipides (protozoaires) Mannane, glucuronozylomannane (champignons)
TLR5	Flagelline (bactérie)
TLR6	Diacyl lipopeptides (bactérie)
TLR7/TLR8	Molécules synthétiques similaires à imidazoquinoline, ssRNA (virus) Fonction immune de TLR8 chez la souris n'est pas connue
TLR9	CpG ADN (bactéries, protozoaires, virus) Hémazine (protozoaires)
TLR10 (pseudogène chez les souris)	Peut être hétérodimère avec TLR1 et TLR2, fonction inconnue
TLR11 (pseudogène chez l'humain)	Composants non connus chez les bactéries uropathogéniques
TLR12 (souris)	Fonction inconnue
TLR13 (souris)	'Unmethylated motif' present dans l'ARNr 23S

Version adaptée de plusieurs revues de littérature (233, 293, 296)

TLR2 est considéré comme un récepteur 'versatile' puisqu'il reconnaît une variété de composants microbiens tels que les lipoprotéines/lipopeptides de bactéries à Gram - et à Gram +, le PGN et le LTA de bactéries à Gram + (297). Le PGN a longtemps été utilisé comme agoniste de TLR2. Cependant, les préparations de PGN sont généralement contaminées par le LTA et de nouvelles méthodes de purification ont révélé que la reconnaissance du PGN est plus susceptible de se produire par l'intermédiaire de NODs (298, 299). L'activité agoniste du LTA pour TLR2 est aussi un sujet de controverse puisque des préparations de LTA de *S. aureus* ont montré une contamination par des lipoprotéines et que ces contaminants sont importants dans la reconnaissance via TLR2 (300, 301).

TLR2 forme généralement des hétérodimères avec TLR1 ou TLR6. Plus précisément, TLR2/TLR1 reconnaît les triacyl lipopeptides à partir de bactéries à Gram - alors que TLR2/TLR6 reconnaît les diacyl lipopeptides de bactéries à Gram + (302, 303). Les différences dans la reconnaissance de lipoprotéines par ces hétérodimères se reposent essentiellement sur la capacité de TLR1 et TLR6 de lier les chaînes lipidiques des lipoprotéines. MD2, physiquement associé avec le TLR2, renforce la reconnaissance par ce dernier. Cependant, cette association est plus faible qu'avec TLR4 (304). Finalement, quelques lipoprotéines peuvent aussi induire l'activation indépendante de TLR1 et TLR6 (305).

De plus, beaucoup d'études rapportent les interactions entre TLR2 et d'autres récepteurs comme le CD14, les 'scavenger receptors' (SR), les intégrines et une gamme d'autres récepteurs, tous des facteurs importants dans la fonction de TLR2 (298, 306). CD14, lui, augmente significativement l'activation de TLR2 en facilitant la liaison de lipopeptides aux TLR2 hétérodimériques (307). Plusieurs classes de SRs sont liées à la fonction TLR2 et sont associées à TLR2 en ce qui concerne la reconnaissance de bactéries intactes. Le SR A est capable de lier les bactéries à Gram + grâce au LTA et aux différents ligands de parois bactériennes de *N. meningitidis*, de l'espèce *Streptococcus*, de *S. aureus*, entre autres (298). CD36 permet aussi la détection de certains agonistes de TLR2 (diacyl lipopeptides et le LTA) de *S. aureus* (308, 309). L'interaction de lipopeptides avec TLR2 est fortement amplifiée par la présence de corécepteurs mais aussi grâce aux radeaux lipidiques reliés à ce récepteur (310). En effet, la perturbation des radeaux lipidiques a un effet significatif sur les réponses immunitaires induites par TLR2 (298, 311, 312). L'induction de la translocation des corécepteurs de TLR2 peut donc être considérée comme une étape

cruciale dans la fonction des TLR2. Dans l'ensemble, plusieurs récepteurs agissent comme corécepteurs avec TLR2, mais d'autres recherches sont nécessaires pour déterminer la mécanistique découlant de ces interactions. Plusieurs études suggèrent des similitudes avec TLR4, mais comparativement à TLR2, la seule évidence à l'heure actuelle est l'interaction directe avec CD14 (298). La Figure 19 montre les divers récepteurs impliqués comme corécepteurs de TLR2.

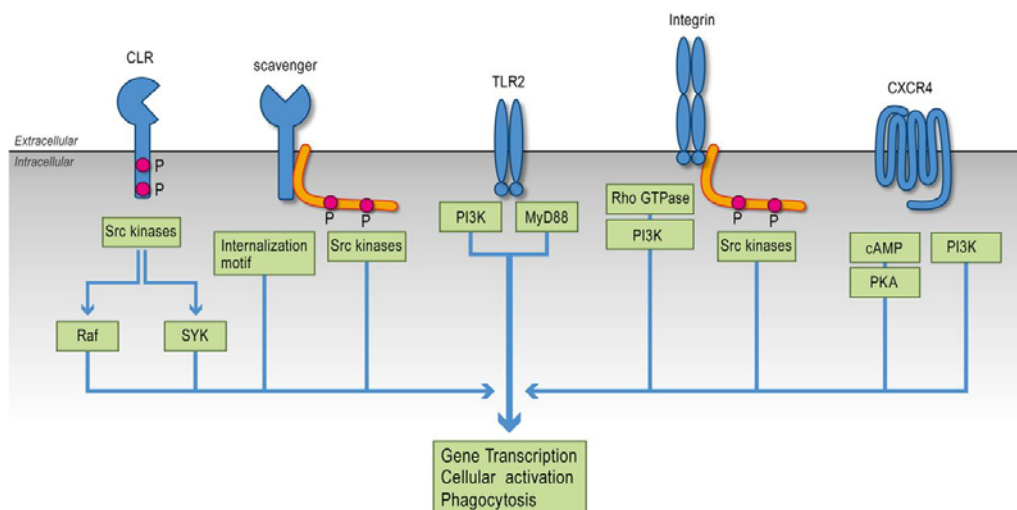


Figure 19. Schéma des voies de signalisation entre TLR2 et divers récepteurs (298).

Abbréviations : CLR, Lectine de type C (Dectin-1); TLR, récepteur de type Toll; CXCR4, 'CXC chemokine receptor 4'

L'interaction des TLRs avec des ligands induit la dimérisation des récepteurs, ce qui amène le recrutement de protéines adaptatrices et de kinases impliquées dans la signalisation intracellulaire (Figure 20). L'activation des voies de signalisation des TLRs amène ultimement la production de cytokines pro-inflammatoires pour préparer le système immunitaire à l'infection (234, 313).

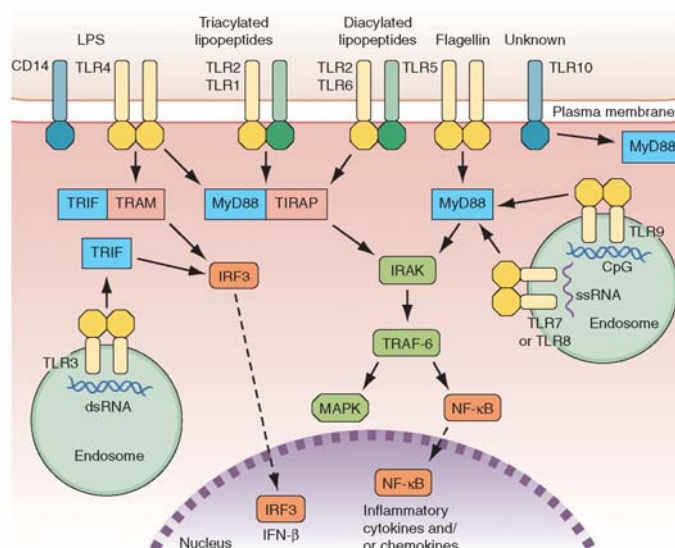


Figure 20. Vue d'ensemble des principales voies de signalisation des TLRs (314).

Abbreviations : IRAK, 'IL-1 receptor kinase'; IRF3, 'interferon regulatory factor 3'; LPS, lipopolysaccharide; MAPK, 'mitogen-activated protein kinases'; MyD88, 'myeloid differentiation primary response gene 88'; NF- κ B, facteur nucléaire κ B; TLR, récepteur de type Toll; TRIF, 'TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β '.

Les principales protéines adaptatrices qui se lient au domaine intracellulaire des TLRs pour activer la réponse pro-inflammatoire sont le 'myeloid differentiation primary response gene 88' (MyD88) et le 'TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ' (TRIF). Ensemble, MyD88 et TRIF amènent la production de nombreuses cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, le CXCL10 et l'IFN- γ (315). De plus, elles interviennent aussi au niveau des AMPs, des molécules de co-stimulation, des molécules du CMH, et d'autres effecteurs nécessaires pour armer la cellule de l'hôte contre l'agent pathogène envahisseur (235). En général, les TLRs activent une voie de signalisation commune ainsi que des voies de rechange permettant d'induire des réponses appropriées et effectrices contre différents types d'agents pathogènes. L'activation des voies de signalisation des TLRs provient des domaines TIR cytoplasmiques. Cela leur permet d'utiliser les mêmes composants de signalisation que l'IL-1R. À ce jour, il est reconnu que la voie de signalisation des TLRs se compose d'au moins une voie dépendante de MyD88 qui est commune à tous les TLRs, à l'exception de TLR3, et une voie indépendante de MyD88 (également connu comme la voie dépendante de TRIF) qui implique TLR3 et TLR4 (233, 234, 295). Dans la voie dépendante de MyD88 (Figure 20), les TLRs recrutent l' 'IL-1 receptor kinase' (IRAK) au complexe des récepteurs par l'intermédiaire de MyD88, suivie de l'activation de TRAF6, ce qui conduit ultimement à l'activation de NF- κ B et sa translocation jusqu'au niveau du noyau pour que ce dernier se lie à des régions spécifiques de l'ADN et régule à la hausse un certain nombre de gènes pro-inflammatoires impliqués dans la défense de l'hôte. Plusieurs ligands de TLR activent aussi les MAPK dont JNK, p38 et Erk (233, 234). La voie indépendante de MyD88 implique l'activation du facteur de transcription 'interferon regulatory factor 3' (IRF3), et par conséquent, l'induction de l'IFN- β , qui, à son tour, conduit à l'induction de plusieurs gènes inductibles à l'IFN (233).

Les TLRs ont été identifiés chez la plupart des types de cellules et peuvent être exprimés soit de manière constitutive ou soit de manière inductible au cours de l'infection (234). Ils sont préférentiellement, mais pas exclusivement, exprimés chez les APCs, y compris les DCs, les macrophages et les lymphocytes B (234, 289). Chez les DCs, la

signalisation des TLRs provoque une maturation des DCs pour devenir ainsi des APCs et favoriser la phagocytose, l'expression de molécules de co-stimulation (telles que CD40, CD80 et CD86), la modulation du CMH et la sécrétion de cytokines et de chimiokines, et par conséquent, avoir un impact sur l'activation des cellules T (234, 294). Les TLRs sont exprimés aussi sur les cellules NK, indépendamment de leur état d'activation et peuvent, en synergie avec des signaux médiés par des cytokines ou chimiokines, activer la fonction des cellules NK (296).

3.4.2 Récepteurs de type 'nucleotide-binding oligomerization domain' (NOD)

Peu de temps après la découverte des TLRs transmembranaires, il est devenu évident que des récepteurs intracellulaires étaient nécessaires pour la surveillance au niveau du cytosol. C'est le cas des NLRs qui sont des protéines intracellulaires dont les recherches ont été intensives depuis la dernière décennie. Structurellement, les NLRs ont une architecture typique en trois parties avec un domaine de liaison nucléotidique central conservé, ce qui restreint l'activité catalytique des protéines des NLRs. Ce domaine central est nommé 'central nucleotide-binding domain' (NACHT) de part la présence de la 'neuronal apoptosis inhibitory protein' (NAIP), la 'neuronal apoptosis inhibitory protein MHC class II transcription activator' (CIITA) et l' 'incompatibility locus protein from *Podospora anserina*' (HET-E) et finalement la 'telomerase-associated protein' (TP1) (316). La région C-terminale des protéines NLRs est une série de LRRs qui initierait l'activation du NLR après la reconnaissance du ligand, bien que ce mécanisme ne soit pas encore clair. Le domaine effecteur N-terminal, qui spécifie la fonction du NLR, est moins conservé. En effet, les NLRs peuvent abriter soit un 'pyrin domain' (PYD), un domaine de recrutement dépendant du 'caspase-activation and recruitment domain' (CARD) et un 'baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat' (BIR).

À ce jour, la famille des NLRs inclut 22 et 34 gènes chez l'humain et la souris, respectivement, chacun jouant des rôles différents dans la reconnaissance de pathogènes, au niveau de l'homéostasie, de l'apoptose ou du développement de l'intestin (317, 318). Les membres de la famille NLR peuvent être divisés en deux groupes. Un groupe comprend les récepteurs NOD1 et NOD2 qui activent divers facteurs de transcription/activation tels que NF- κ B, IRF et MAPKs pour induire la production de cytokines pro-inflammatoires, des AMPs et les IFNs de type I. Le second groupe, qui se compose de NLRs tels que NLRP3, NLRC4,

NALP1 et NAIPs, régule l'assemblage d'un complexe multiprotéique nommé l'inflammasome, conduisant à l'activation de la procaspase-1 et en outre, à la maturation de la famille des cytokines de l'IL-1 et l'IL-18 (317, 319). Non seulement les NLRs peuvent reconnaître des composants microbiens (PAMPs), mais aussi des motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires (DAMPs) tels que l'adénosine triphosphate (ATP), l'ADN mitochondrial et les ROS (320).

Le Tableau VI résume les principaux membres de la famille des NLRs et leurs ligands associés. Le récepteur NOD2 a été davantage étudié dans le cadre de cette thèse.

Tableau VI. PAMPs et DAMPs détectées par les NLRs.

NLR	PAMP ou DAMP
NLRC4	Flaglèlle
	Sécrétions de Type III et IV
NAIP	Flaglèlle
NLRP1	MDP
	Toxine léthale de l'anthrax
NLRP3	ATP
	ARN viral
	MDP
	<i>Amyloid-β</i>
	ARN double brin
	Poly(I-C)
NOD1	MDP provenant du PGN de bactérie à Gram -
NOD2	MDP provenant du PGN de bactérie à Gram +

Tableau adapté de Geddes *et al.* 2009 (321).

Abbreviations : DAMP, motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires; PAMP, motifs moléculaires associés aux pathogènes; NAIP, 'neuronal apoptosis inhibitory protein'; NLR, 'nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptor'; NLRC4, 'NLR family, CARD domain-containing 4' (aussi connue comme IPAF); NLRP1, 'NLR family, pyrin domain-containing 1' (aussi connue comme NALP1).

NOD2, comme NOD1, est crucial dans la réponse immunitaire innée lors d'infections bactériennes. NOD2 est une protéine du cytosol qui répond à des fragments de PGN bactériens et initie la transcription du gène NF- κ B et l'activation des MAPKs. NOD2 détecte

le muramyl dipeptide (MDP) qui est présent dans tous les PGNs bactériens (autant chez les bactéries à Gram - que chez les bactéries à Gram +). De plus, NOD2, peut aussi reconnaître des parasites et des virus (322). Fait intéressant, NOD2 a été le premier gène à être associé à la maladie de Crohn et il reste l'un des facteurs de prédisposition génétique qui confère le plus grand risque du développement de cette maladie (323). Plus précisément, des mutations dans le gène de NOD2 pourraient promouvoir la maladie de Crohn par un défaut de régulation des réponses aux bactéries commensales et/ou pathogènes, plutôt que d'agir directement comme un facteur déclencheur de la maladie. De plus, la production de facteurs antimicrobiens par les cellules épithéliales des cryptes et des cellules de Paneth (où le gène de NOD2 est fortement exprimé) aide à maintenir l'intégrité de la barrière intestinale et sont les sites de sécrétion de la défensine α . Chez l'humain, une expression altérée des défensines α est observée chez les patients atteints de la maladie de Crohn (324). Cependant, une étude a montré que la réduction de l'expression des défensines α chez les patients atteints de la maladie de Crohn est indépendante de NOD2 (325).

De nombreuses études montrent que NOD2 et la voie des TLRs se croisent à plusieurs niveaux dans les systèmes cellulaires. Toutefois, la preuve directe que les protéines NODs et TLRs coopèrent à la défense de l'hôte contre les agents pathogènes *in vivo* reste rare. Par exemple, l'élimination bactérienne, suite à une infection systémique par l'espèce *Listeria* a été montrée pour être dépendante de NOD1 et NOD2 lorsque les animaux avaient déjà reçu du LPS qui active le TLR4. Des travaux supplémentaires sont justifiés afin de mieux comprendre l'interaction fonctionnelle entre les TLRs et les protéines NODs *in vivo*.

3.4.3 Autres récepteurs importants

Un certain nombre de bactéries encapsulées interagissent avec des cellules phagocytaires via des lectines de surface. Pour les besoins de cette thèse, seuls les récepteurs exprimés sur les DCs et pouvant reconnaître des bactéries encapsulées seront abordés. Tout d'abord, les récepteurs classiques de lectines de type C (CLR) peuvent être divisés en deux grandes catégories : les lectines C de type mannose ou les lectines C de type galactose. Les lectines C de type mannose comprennent le récepteur du mannose (MR), DC-SIGN, Dectin-1 ou Langerine qui possèdent une spécificité de base pour le

mannose et/ou les glycanes. Pour ce qui est des lectines C de type galactose, ce groupe comprend la lectine type galactose (MGL) qui reconnaît le Gal ou des structures de glycanes associées au GalNAc (326). Les CLRs contribuent à la réponse immunitaire innée par la reconnaissance de pathogènes et par l'internalisation des antigènes pour la présentation sur des molécules du CMH. Certains CLRs possèdent des propriétés intrinsèques de signalisation et sont ainsi capables de moduler les réactions immunitaires. Le MR, par exemple, reconnaît des hydrates de carbone exprimés sur la surface d'un certain nombre de bactéries, y compris *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ainsi que *P. aeruginosa* et favorise leur internalisation.

Les récepteurs du complément (CR) jouent aussi un rôle important dans la reconnaissance non-spécifique des pathogènes. Le CR3 (CD11b/CD18, MAC-1) est une intégrine qui régule la phagocytose opsonique et non-opsonique. En effet, deux sites de reconnaissance ont été identifiés : un site qui reconnaît le iC3b à la surface du pathogène et un autre site de type lectine avec la capacité de lier certains PS. Pour une pleine activation du récepteur, les deux sites doivent être activés. Cette activation se fait en deux étapes où il y a reconnaissance d'iC3b via le premier site du CR3, puis la reconnaissance du PS, qui peut-être exogène ou provenir du pathogène opsonisé (327, 328).

Les Siglecs sont une famille de protéines transmembranaires de type 1 avec de nombreux domaines Ig variables. Les Siglecs peuvent être divisées en un sous-groupe conservé (sialoadhésine, CD22 et d'autres) et un sous-groupe reliée au CD33 (CD33rSiglecs) dont 11 sont caractérisés chez l'humain et 8 chez la souris (329). Par exemple, la sialoadhésine peut moduler les interactions dépendantes de l'acide sialique avec des cellules myéloïdes et lymphoïdes (330), et est donc susceptible de jouer un rôle dans le trafic cellulaire et dans les fonctions de défense de l'hôte. Les CD33rSiglecs sont un sous-groupe de Siglecs qui évolue rapidement et ils sont exprimés de manière différentielle sur pratiquement toutes les cellules du système immunitaire inné, y compris les macrophages, les DCs et les neutrophiles (331). De nombreuses études *in vitro* ont démontré la capacité des CD33rSiglecs d'avoir une action inhibitrice dont la régulation négative de la signalisation des cellules T et l'inhibition de l'activité cytotoxique chez les cellules NK (332). Ces récepteurs pourraient être importants dans l'élimination de pathogènes et/ou dans les fonctions de présentation antigénique des cellules myéloïdes, en particulier lorsque cela concernent des pathogènes sialylés (329, 331).

3.4.4 Récepteurs impliqués dans la reconnaissance de GBS et de *S. suis*

Le rôle du TLR2 dans la pathogénèse de ces bactéries a été précédemment discuté. Des études *in vitro* ont proposé que TLR2 est impliqué à un certain niveau dans l'activation et la production de cytokines. Par exemple, l'activation des macrophages péritonéaux par le GBS de type III est indépendant du TLR2 et TLR6, alors que la réponse face au 'secreted heat-labile soluble factor released' est dépendant du TLR2 (333). De plus, le LTA de GBS de type III est également reconnu par TLR2/TLR6, mais ne contribue pas significativement à l'activation des macrophages (334). Alors que la majeure partie des gènes induits chez les macrophages par GBS de type III tué par la chaleur sont indépendants du TLR2, l'induction d'IL-6, IL-1 β et la lipocaïne 2 est sévèrement altérée en absence du TLR2 (335). Malgré que l'induction de l'activation de la 'I κ B kinase' (la kinase régulant l'activation de NF- κ B), et non les MAPKs JNK et p38 chez les macrophages infectées par GBS de type V, soit bloquée en absence de MyD88, elle est seulement partiellement inhibée en absence du TLR2 (336). Finalement, l'étude avec une lignée de fibroblastes transfectées avec TLR2 humain n'est pas arrivée non plus à démontrer un rôle du TLR2 dans les interactions avec GBS de type III tués à la chaleur comparativement à *L. monocytogenes* (337). Cependant, une étude *in vivo*, dans un modèle d'infection sublétales chez la souris avec GBS de types III et V, a montré que TLR2/MyD88 régule la production de TNF- α et d'IL-6 et contribue à l'élimination bactérienne alors qu'il est délétère lors de fortes doses de GBS causant la septicémie (338). Une autre étude a également montré que les souris déficientes en TLR2 meurent plus rapidement lorsqu'infectées avec GBS de type IV que les souris contrôles, et ce, peu importe la dose employée (339). Les auteurs ont conclu que l'absence du TLR2 était associée à une incapacité de l'hôte à résister à une infection à GBS de type IV. Récemment, Andrade *et al.* (2013), ont démontré que la production d'IL-10 induite par TLR2 est un élément important dans la susceptibilité néonatale face à une infection à GBS de type III (340). Suite à toutes ces observations, nous pouvons dire que le rôle du TLR2 dans l'immuno-pathologie des maladies causées par GBS est controversé et semble dépendre du modèle d'infection, de la dose bactérienne, du sérotype utilisé ainsi que le type cellulaire analysé.

MyD88 est la seule protéine adaptatrice connue pour intervenir dans la production de cytokines en contact avec la paroi bactérienne de GBS (32). En aval de MyD88, la paroi

bactérienne de GBS amène la production de cytokines inflammatoires grâce à notamment les MAPKs Erk1/2 (kinases régulées par des signaux extracellulaires 1 et 2), JNK et p38 (338, 341). Un autre PAMP putatif de GBS est la β -H/C. Certaines études ont rapporté que l'expression de la β -H/C est associée à des événements cellulaires typiquement reliés à la production de cytokines et à l'apoptose (62, 342). Cependant, le récepteur lié à la reconnaissance de la β -H/C de GBS n'était pas encore identifié.

Comme mentionné précédemment, GBS exprime à sa surface deux PS, la CPS qui est sérotype-spécifique et l'antigène du Groupe B (GBC) qui est groupe-spécifique. Le rôle inflammatoire de la CPS ne fait pas consensus, mais il est suggéré que la CPS de GBS ne serait pas un composant inflammatoire essentiel pour GBS (32, 343, 344). Le GBC a été rapporté comme un stimulus inflammatoire relativement puissant et le CR3 serait impliqué dans sa reconnaissance (32, 344, 345). Tout récemment, un mutant GBS déficient en GBC a été caractérisé, mais sa capacité d'activation des cellules immunitaires n'a pas encore été démontrée (346). Par contre, autant pour la CPS que pour le GBC, il est difficile d'obtenir une préparation pure sans contamination avec le PGN et la capacité pro-inflammatoire observée dans certaines études pourrait être imputée à ces impuretés (32). Malgré tout, le PGN serait plus efficace que le LTA ou la CPS pour favoriser la libération de cytokines par les monocytes, en particulier pour le TNF- α et de l'IL-1 (98).

Depuis les améliorations dans la purification du PGN, la plupart des chercheurs sont moins enclin à accepter le PGN comme un agoniste du TLR2 et il serait plutôt reconnu comme un PAMP pour le récepteur intracellulaire NOD2 (323, 347). Au début de ce projet de thèse, une seule étude *in vitro* avait abordé ce sujet n'a pas pu réussir à démontrer un rôle clair de NOD dans les interactions entre GBS et les macrophages (348). Aucune étude non plus à l'époque n'avait démontré le rôle des récepteurs intracellulaires (autre que les TLRs et les NODs) et l'activation de l'inflammasome. Toutefois, un système de reconnaissance intracellulaire de GBS semblait concevable, puisque l'ADN de GBS se retrouve dans le cytosol de macrophages infectées par GBS et induit la production des IFNs (348).

Le CR3 (C11b/CD18) a été suggéré également en tant que récepteur de signalisation pour GBS (344, 349). En effet, une étude démontre que la CPS de GBS de type III peut être reconnue par le site des lectines du CR3 chez les neutrophiles et

promouvoir leurs fonctions (327). Par contre, CR3 n'est pas un récepteur essentiel pour GBS, du moins, selon le type cellulaire étudié (32). Il a été montré que les DCs folliculaires de souris déficientes en CR3 et CR2 ont plus de difficulté à reconnaître la CPS de GBS de type III dans les centres germinaux, et par conséquent, réduit la réponse adaptative face à la CPS de type III (91).

L'acide sialique de GBS interagit avec certains CD33rSiglecs humains, y compris Siglec-5 et Siglec-9 exprimés sur les neutrophiles et les monocytes humains et pourrait exercer des effets suppresseurs sur la réponse immunitaire innée (332). En plus de la liaison à l'acide sialique, certaines souches de GBS peuvent également se lier au Siglec-5 par l'intermédiaire de la protéine β , qui est ancrée dans la paroi bactérienne et qui peut interférer avec l'action des macrophages (350-352). Récemment, il a été démontré que la protéine β de GBS lie à la fois le Siglec-5 et le Siglec-14 sur les neutrophiles humains et que cette interaction induit une suppression immunitaire par l'activation de la MAPK p38 (353). Contrairement aux autres études avec les Siglecs, la sialoadhésine reconnaît GBS et participerait à l'activité des macrophages au niveau de la phagocytose et de l'élimination intracellulaire (354). L'expression de la sialoadhésine chez les macrophages murins de la rate empêcherait GBS de circuler dans le sang et de se propager vers d'autres organes, ce qui réduirait la mortalité chez l'hôte (354).

Dans le cas de *S. suis*, l'importance du TLR2 a aussi été démontrée chez des types cellulaires murins, porcins et humains (212, 230, 231, 355, 356). Chez les monocytes humains, la production de cytokines et chimiokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, CCL2, IL-8) semble être dépendante du TLR2 et de CD14 et non du TLR4 (210, 215). Chez la souris, TLR2 est aussi important dans la production de cytokines (215). Cette importance semble dépendre de la souche. En effet, des infections *in vivo* chez des souris déficientes en TLR2 avec des souches de *S. suis* de différentes origines (une d'origine européenne et l'autre d'origine chinoise) montrent que TLR2 est important dans la pathologie des infections causées par la souche européenne alors que la souche hypervirulente chinoise n'est pas reconnue principalement via TLR2 (357). De plus, la présence de la CPS joue un rôle dans les interactions de *S. suis* avec les TLRs. En effet, en l'absence de la CPS, les composants de la paroi bactérienne sont accessibles et interagissent de manière dépendante ou indépendante au TLR2 pour la production de cytokines et de chimiokines, tandis que la présence de la CPS contribue à la production de CCL2 de manière indépendante de MyD88

(215). Wichgers Schreur *et al.* ont démontré que les lipoprotéines de *S. suis* activent TLR2/6 mais pas TLR1/2 et que les différences entre les sérotypes reposeraient sur les variations dans la composition de la paroi bactérienne (151). Étant donné l'altération complète de la production de cytokines chez les macrophages déficients en MyD88, d'autres TLRs pourraient également être impliqués. Récemment (2012), des études *in vitro* avec des cellules du sang périphérique humain ont montré que TLR2, TLR6 et TLR9 jouent un rôle dans l'activation de ces cellules par *S. suis* (355).

Finalement, au début de ce projet de thèse, les données concernant le rôle de récepteurs extracellulaires ou intracellulaires dans la reconnaissance de GBS ou de *S. suis* chez les DCs étaient inexistantes.

3.5 Rôle des interactions DCs – cellules NK dans la réponse innée

3.5.1 Cellules dendritiques (DCs)

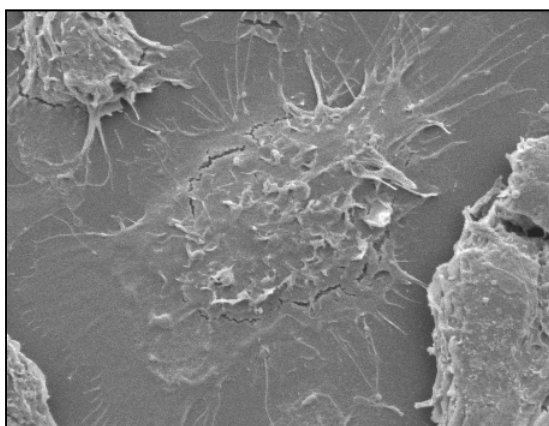


Figure 21. Image par microscopie électronique à balayage de DCs dérivées de la moelle osseuse (Image non-publiée, propriété Dre Mariela Segura).

Les DCs ont été identifiées et caractérisées pour la première fois dans une série d'études publiées en 1973 par Steinman et Cohn où ils ont étudiés des cellules adhérentes provenant de la rate chez la souris et ont découvert, par la même occasion, une sous-population avec une caractéristique unique d'extensions cellulaires 'dendritiques' (358, 359). C'est par la suite que ces auteurs ont nommé ces cellules les 'cellules dendritiques'. Depuis, un intérêt grandissant a été porté sur ce groupe particulier de phagocytes. Les DCs peuvent prendre diverses formes, s'étendre et se rétracter selon plusieurs processus

cellulaires (360). Elles dérivent de la moelle osseuse et sont une population qui correspond à environ 1% des cellules immunitaires, mais se retrouvent autant dans les tissus lymphoïdes que non lymphoïdes. Les DCs sont considérées comme étant les plus puissantes des cellules présentatrices d'antigène (APCs) (358). Le terme APC regroupe les cellules qui peuvent exprimer les molécules du CMH de classes I et II telles que les macrophages, les DCs et les cellules B et qui ont aussi la capacité d'endocytose ainsi que de communiquer avec les cellules T grâce à des antigènes (Tableau VII). Plus précisément, les DCs expriment constitutivement les molécules du CMH de classes I et II et ont une capacité supérieure à moduler l'immunité des cellules T que les macrophages et les cellules B (359, 360). Outre l'induction ou la tolérance des cellules T, les DCs exercent également plusieurs fonctions immunologiques dont la modulation de diverses réponses, entre autre, par les cellules NK et par les lymphocytes B (361). Les DCs sont des cibles prometteuses pour la vaccination, pour l'immunothérapie dans les cas de cancer, pour les maladies auto-immunes et pour les allergies (361). Cependant, ces aspects ne sont pas abordés dans ce projet de thèse.

Tableau VII. Spécialisation des différentes cellules présentatrices d'antigènes (APCs)

	DCs	Macrophages	Cellules B
Capture antigénique	-Phagocytose -Macropinocytose, -Endocytose médiée par des récepteurs	-Phagocytose -Endocytose médiée par des récepteurs	Endocytose médiée par des récepteurs via des Igs
Expression de CMH de classe II	-Expression constitutive très élevée -Inductible	-Faible taux d'expression -Inductible	-Expression constitutive -Inductible
Fonction de la présentation antigénique	Activation des cellules T naïves	Recrutement des cellules T auxiliaires CD4+ pour l'activation des cellules B naïves	Recrutement des cellules T auxiliaires pour la production d'anticorps

Abbréviations : APC, cellule présentatrice d'antigène; DC, cellule dendritique; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité; Ig, immunoglobuline

Il a d'abord été proposé que les DCs étaient essentiellement une seule population cellulaire distribuée à travers divers endroits chez l'hôte. Cependant, il est devenu clair au fil des années que les DCs sont une population hétérogène et peuvent être classées en sous-

populations distinctes (362). En fait, la diversité fonctionnelle des sous-populations de DCs est liée à leur état de différenciation, leur localisation anatomique spécifique ainsi que leurs différentes interactions avec les antigènes et les cellules du système immunitaire (361, 363). Ces sous-populations de DCs identifiées chez la souris et chez l'humain ont comme dénominateur commun la capacité d'internaliser et de présenter les antigènes aux lymphocytes T (358, 364). Par contre, les DC murines ont été largement utilisées en recherche pour étudier les rôles des DCs dans la génération et la régulation d'une immunité spécifique face à divers pathogènes. Même s'il est clair que des différences existent entre les DCs d'origine murine et humaine, il est accepté que les DCs murines soient pertinentes et fournissent un modèle approprié dans un contexte de santé humaine. Dans le cadre de ce projet de thèse, l'emphase dans les prochaines sections sera davantage mise sur les DCs d'origine murine.

3.5.1.1 DCs murines

3.5.1.1.1 Origines et développement

Beaucoup d'efforts dans les dernières années ont été mis pour comprendre et retracer les précurseurs qui conduisent à la génération de DCs ainsi que les facteurs de croissance et de transcription requis (365, 366). La génération de DCs est le résultat d'une remarquable flexibilité dans leur lignée de différenciation. En effet, un simple précurseur myéloïde (CMP) ou lymphoïde (CLP) peut se différencier en DCs conventionnelles ou en DCs plasmacytoïdes (pDC), respectivement (361). Cependant, des études récentes démontrent également que la différenciation hématopoïétique n'est pas linéaire et se déroule plutôt en différents stades (365). Les sous-populations de DCs murines ne sont donc pas aussi facilement séparées en deux lignées distinctes.

Les conditions environnementales comme l'emplacement et la présence d'une inflammation ou d'une infection pourraient dicter la différenciation de précurseurs lymphoïdes ou myéloïdes en DCs (361). Par exemple, les DCs peuvent être séparées en sous-populations sur la base de l'expression de CD4 et de la chaîne homodimérique CD8 ($CD8\alpha$), des marqueurs identifiés à l'origine pour être confinés principalement aux cellules T (358). Bien que l'origine lymphoïde des DCs a été démontrée que pour les DCs $CD8\alpha^+$, la similitude dans le phénotype des DCs thymiques aux DCs spléniques $CD8\alpha^+$ et aux DCs

des ganglions lymphatiques suggère une origine commune (363). Cependant, l'étude de Traver *et al.* (367) indique que le CD8 α sur les DCs n'est pas indicateur d'une origine lymphoïde, mais pourrait plutôt tenir compte de la maturation ou de l'état de différenciation et, une fois défini, pourrait prédire la fonction des DCs. En général, la différenciation des DCs est initiée dans la moelle osseuse et se poursuit dans d'autres organes lymphoïdes tels que la rate et les ganglions lymphatiques.

Mise à part les DCs de l'épiderme, les cellules de Langerhans (LC), la plupart des DCs conventionnelles ont une courte durée de vie et sont constamment remplacées par des précurseurs. Les cellules souches hématopoïétique CD34⁺ (HSC) se retrouvent dans la moelle osseuse et sont CD11c⁻ Lin⁻ avec une capacité de prolifération élevée. Les premiers précurseurs, les CLPs et les CMPs, sont retrouvés autant chez la souris que chez l'humain. Il a été observé que le transfert adoptif de CLPs ou de CMPs (discriminés par le niveau d'expression ou la présence/absence de plusieurs marqueurs dont le récepteur de l'IL-7 et Sca-1 [présent chez les CLPs] ainsi que c-Kit et Fc γ R [présent chez les CMPs]) dans des animaux irradiés favorise la production de DCs conventionnelles et de pDCs chez la souris. Des cultures *in vitro* de CLPs ou de CMPs d'origine humaine laissent également suggérer une différenciation similaire (367-369). De plus, les CMPs seraient plus efficaces dans la génération de DCs conventionnelles de la rate et des ganglions lymphatiques alors que les CLPs sont plus puissants à produire des DCs conventionnelles du thymus (367, 368). Malgré tout, il reste qu'un facteur est important dans le développement potentiel des DCs conventionnelles à partir des HSCs et il s'agit de la présence du 'fms-related tyrosine kinase 3' (Flt3) (370-372). Dans une étude, d'Amico *et al.* (370) ont proposé que l'activité de différenciation des précurseurs de DCs dans la moelle osseuse était corrélée à l'expression du Flt3 à leur surface. De plus, ils ont indiqué que les CLPs (qui sont pour la plupart Flt3⁺) sont plus efficaces dans la génération de DCs, en particulier les pDCs, que la fraction Flt3⁺ des CMPs (361). Le ligand Flt3 cible les progéniteurs hématopoïétiques primitifs dans la moelle osseuse et induit leur expansion et leur différenciation (373). De plus, le nombre de DCs d'origine lymphoïde ou d'origine myéloïde augmente considérablement suite à l'injection de ce ligand (363). Le 'granulocyte-macrophage colony-stimulating factor' (GM-CSF) est une cytokine critique dans la différenciation des HSCs et des monocytes murins en DCs conventionnelles spléniques et est à ce jour la cytokine clé pour la génération de DCs pour les vaccins (374). Le GM-CSF contrôle également l'expression de CD103 sur les DCs retrouvées dans les tissus et cette expression serait impliquée dans les dernières étapes de

la maturation des DCs ainsi que dans l'acquisition des capacités à faire la présentation croisée des antigènes (375). Plusieurs facteurs de transcription sont également impliqués dans la différenciation des DCs dont PU.1, Ikaros et 'growth factor independent 1' (GFI1) (376).

Sur la base relative de la différenciation potentielle des DCs à partir des CLPs et CMPs, il a été établi que la différenciation thymique des DCs résulte d'une contribution égale des deux précurseurs, alors que les DCs périphériques dérivent principalement des CMPs (368, 377). Les pré-DCs et les monocytes ont aussi été proposés pour être impliqués dans la génération de DCs après leur recrutement aux sites réactifs (378).

Afin de faciliter une meilleure compréhension et une visualisation de l'évolution des DCs, voici un modèle théorique de l'origine du développement des DCs chez la souris.

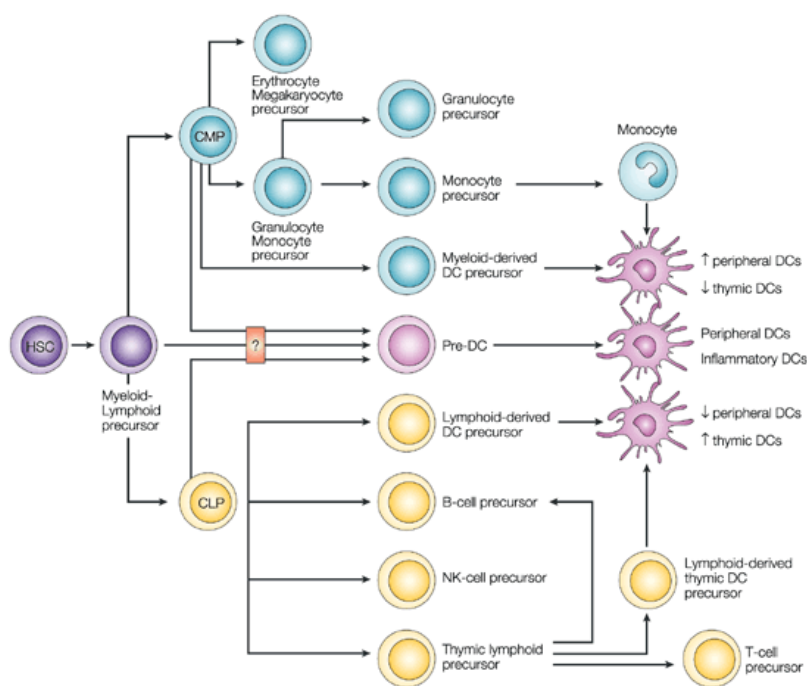


Figure 22. Modèle théorique de l'origine du développement des DCs chez la souris (361).

La différenciation des DCs, incluant CD8 α -, CD8 α +, les pDCs et les LCs, a été proposée pour se dérouler directement à partir de précurseurs myéloïdes ou lymphoïdes et à partir de précurseurs communs des DCs (Pré-DCs). Sur la base de la différenciation potentielle des DCs et le nombre absolu de progéniteurs communs lymphoïdes (CLPs) ou de progéniteurs communs myéloïdes (CMPs), il a été établi que la différenciation thymique des DCs résulte d'une contribution égale des deux précurseurs, alors que les DCs périphériques dérivent

principalement des CMPs. Les précurseurs myéloïdes des DCs ont été montrés pour dériver de la fraction de CMPs qui exprime le 'fms-related tyrosine kinase 3' (Flt3). Les précurseurs lymphoïdes des DCs, qui dérivent des CLPs et qui sont localisés dans la moelle osseuse et les précurseurs lymphoïdes du thymus, peuvent générer des cellules T, des DCs ainsi que des cellules B. Les Pré-DCs et les monocytes ont été proposés pour être impliqués dans la génération de DCs après le recrutement aux sites d'inflammation. L'origine des Pré-DCs provenant de progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes et leur contribution relative à la génération de DCs en relation aux CMPs et CLPs dans des conditions homéostasiques restent à déterminer.

Abbreviations : CMP, progéniteur myéloïde commun; CLP, progéniteur lymphoïde commun; pDC, DCs plasmacytoïdes; LC, cellule de Langerhans.

3.5.1.1.2 Sous-populations de DCs murines

Comme mentionné précédemment, les DCs forment un groupe très hétérogène de différentes populations de cellules basées sur le phénotype, leur emplacement et leur fonction. Une expression élevée des niveaux de CD11c et des molécules du CMH de classe II sont des marqueurs phénotypiques de plusieurs sous-populations de DCs. Cependant, en contraste avec les lymphocytes, il n'y a pas de marqueur spécifique pour l'ensemble des DCs (les lymphocytes T et B sont caractérisés, par exemple, par l'expression du récepteur de cellule T [TCR] ou le récepteur des cellules B [BCR], respectivement).

Plusieurs sous-populations de DCs chez la souris ont été décrites dans de nombreux organes ou tissus et contiennent des DCs immatures ou partiellement matures pouvant subir une maturation complète suite à une activation (379). Selon des études, les marqueurs de différenciation varient. Dans le cadre de cette thèse, l'accent sera davantage mis sur les sous-populations de DCs qui se retrouvent chez la souris adulte. Cependant, il est important de noter l'existence d'autres types de DCs qui se développent dans des conditions d'infection ou d'inflammation (par exemple, la présence de 'Tip-DC' lors d'infection par le *L. monocytogenes* (380)). Ces 'DCs inflammatoires' sont dérivées de monocytes et leur développement peut être induit par des ligands de TLRs pouvant mimer l'infection (381). Malgré cela, les sous-populations de DCs semblent être spécifiques à des environnements définis et les critères phénotypiques et fonctionnels ont permis la classification des DCs chez la souris en 8 principales sous-populations selon la présence de certains marqueurs (Tableau VIII à la page suivante).

Tableau VIII. Principaux types de DCs chez la souris dans les organes lymphoïdes

DC subset	DC type	CD8 α	CD103	CD205	EPCAM (CD326)	CD11b	B220 or CD45RA	DC-SIGN	Langerin (CD207)	Antigen presentation	Major cytokine produced
pDCs	Lymphoid- resident DCs	+/-	-	-	-	-	+	++	-	Poor	IFN α
CD8 α ⁺ DCs	Lymphoid- resident DCs	+	low	+	-	+	-	-	+/-	Cross- presentation on MHC class I; expression of cystatin C	IL-12p70, IFN α
CD4 ⁺ DCs	Lymphoid- resident DCs	-	-	-	-	+	-	-	-	Presentation on MHC class II	
DN DCs	Lymphoid- resident DCs	-	-	-	-	+	-	-	-	Presentation on MHC class II	
CD11b ⁺ DCs	Migratory DCs	-	+/-	+	-	+	-	ND	-	Presentation on MHC class II	
CD103 ⁺ DCs • Lung • Intestine	Migratory DCs	-	+	++	+/-	-	-	-	+	Cross- presentation on MHC class I	
Langerhans cells	Migratory DCs	-	-	++	+	+	-	-	++	Presentation of self antigens for tolerance induction	IL-10
Monocyte- derived DCs	Induced by inflammation	-	-	-	-	+	-	+	-	Cross- presentation	TNF

DC, dendritic cell; DC-SIGN, DC-specific ICAM3-grabbing non-integrin; DN, double-negative; EPCAM, epithelial cell adhesion molecule; IFN, interferon; IL, interleukin; ND, not determined; pDC, plasmacytoid DC.

Le tableau montre les marqueurs de surface phénotypiques des différentes sous-populations de DCs (376).

Abbreviations : DC, cellule dendritique; DN, double négative (CD8 α -CD4-); pDC, cellule dendritique plasmacytoïde; ND, non déterminé; +, présent; -, absent.

Plus précisément, les DCs dans les tissus lymphoïdes peuvent être divisées en CD8 α - et CD8 α + et ces deux sous-populations ont été largement étudiées au cours des dernières années (362). Les DCs CD8 α - comprennent 75% des DCs de la rate chez la souris (358). Cette population peut être subdivisée en CD4- et CD4+ (382). De plus, les DCs CD8 α -, et non les DCs CD8 α +, ont été rapportées pour avoir la capacité d'induire l'activation des cellules B et la différenciation de ces dernières en plasmocytes sécrétant des Igs (361). Bien que les DCs CD8 α - semblent avoir une plus grande capacité d'endocytose que les DCs CD8 α +, des données récentes indiquent que les DCs CD8 α + seulement sont capables d'internaliser des cellules apoptotiques (383). Ces sous-populations peuvent également se différencier par l'expression de certains marqueurs tels que CD11c, CD11b et CD205 (24, 358, 359). La pertinence fonctionnelle de l'expression de CD4 par les DCs CD8 α - reste controversée. Toutefois, ces sous-populations ont été classées comme matures puisqu'ils expriment des molécules de co-stimulation et peuvent activer

efficacement des cellules T allogéniques (358). Toutefois, une maturation plus forte peut être induite chez ces sous-populations suite à des stimuli bactériens. Les DCs qui expriment des niveaux intermédiaires de CD8 α (DCs CD8 α^{int} ; qui ne sont pas inclus dans le tableau VIII), constituent une sous-population spécifique de DCs dans les ganglions lymphatiques. En périphérie, les DCs CD8 α^{int} semblent provenir des LCs (384) et peuvent être des DCs au niveau du derme (DC dermal) tandis que celles au niveau mésentérique semblent provenir de la lamina propria intestinale. Finalement, l'expression de B220 définit l'homologue fonctionnel chez la souris des pDCs humaines. Les pDCs B220+ sont retrouvées dans tous les organes lymphoïdes chez la souris et sont caractérisées par leur capacité à produire de grandes quantités d'IFN de type I en réponse à des infections virales (360, 385). Les pDCs se distinguent également par l'expression de DC-SIGN, Ly6C, CD123, BDCA-2 et BDCA-4 (ces deux derniers sont des marqueurs utiles pour leur identification) et des niveaux intermédiaires ou aucune expression de CD11c (24, 386). Il a été proposé que les pDCs seraient impliquées dans le maintien de la tolérance des lymphocytes T en induisant la différenciation des cellules T régulatrices (Treg), lesquelles peuvent bloquer l'activation des lymphocytes T naïfs par un mécanisme dépendant de la production d'IL-10 (387). Les pDCs peuvent exprimer différents niveaux de CD8 α en fonction de leur emplacement. En plus de ces principales sous-populations de DCs décrites ci-dessus, d'autres sous-populations de DCs ont été décrites dans des organes spécifiques de la souris, y compris le cœur et les reins, bien que la disposition phénotypique et les données fonctionnelles en ce qui concerne ces DCs n'aient pas encore permis de les classer à l'une des sous-populations de DCs mentionnées (361). Le Tableau IX montre un aperçu de sous-populations de DCs dans les organes de la souris.

Tableau IX. Distribution dans les organes chez la souris de certaines sous-populations de DCs (361).

Sous-populations DCs	Thymus	Rate	LN	Plaques de Peyer	Peau	Foie
CD8-	*	+	+	+	-	+
CD8+	+	+	+	+	-	+
LC	-	-	-	-	+	-
pDCs	+	+	+	+	-	ND

Abbreviations : DC, cellule dendritique; int, niveau d'expression intermédiaire; LC, cellules de Langerhans; pDC, cellule dendritique plasmacytoïde; LN, noyau lymphatique; ND, non déterminé; +, présent; -, absent.

* Les DCs CD8⁻ peuvent être détectées dans le thymus, malgré qu'elles constituent une proportion minime des DCs dans cet organe.

Ces sous-populations de DCs diffèrent également dans leur capacité à traiter et à présenter certains types d'antigènes. Par exemple, les DCs CD8 α ⁺ sont spécialisées pour la présentation croisée des antigènes aux cellules T CD8⁺ (via les molécules du CMH de classe I), tandis que les DCs CD8 α ⁻ seraient meilleures pour présenter des antigènes sur les molécules du CMH de classe II aux cellules T CD4⁺ (358). Ces caractéristiques spécifiques des sous-populations de DCs peuvent optimiser leur rôle dans le déclenchement de l'immunité adaptative pour certains types de pathogènes. D'autres signaux provenant de pathogènes et de l'environnement peuvent influencer également la réponse immunitaire subséquente (359).

3.5.1.2 DCs humaines

Similairement aux DCs murines, les DCs humaines proviennent de la moelle osseuse de précurseurs myéloïdes et lymphoïdes (388). Cette production de DCs est promue par le ligand Flt3, le GM-CSF et l'IL-4 *in vitro* (389). Les DCs humaines n'expriment pas de CD8 α , mais expriment différemment le CD4 et le CD11b et, similairement chez la souris, montrent une hétérogénéité fonctionnelle (24).

La classification fonctionnelle anatomique, à partir d'études chez la souris, reconnaît que la fonction des DCs est intimement liée à leur emplacement (390). Les DCs migratoires se promènent à travers les tissus et les DCs résidentes se retrouvent dans les ganglions lymphatiques. Deux autres populations méritent également une considération: les DCs sanguines et les DCs inflammatoires. La figure suivante (à la page suivante) montre un aperçu des sous-populations majeures des DCs chez l'humain.

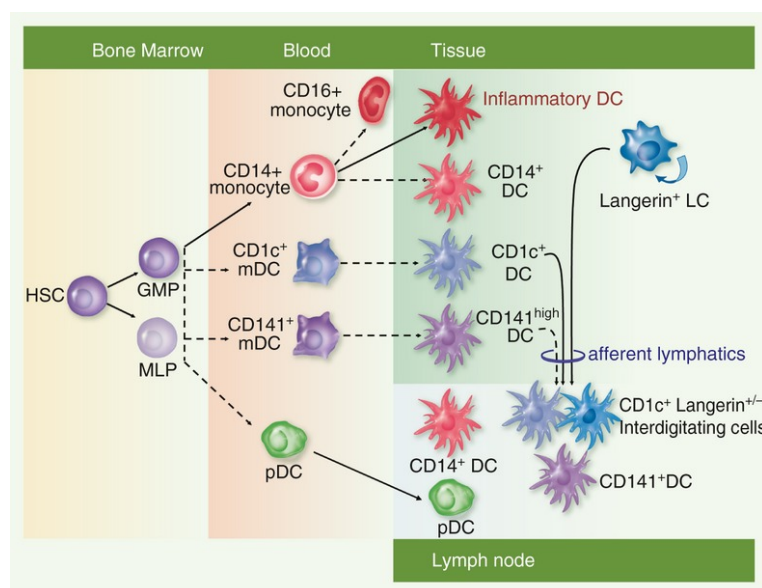


Figure 23. Distribution des sous-populations de DCs majeures dans le sang, les tissus épithéliaux et les ganglions lymphatiques chez l'humain (391).

Les lignes en pointillée indiquent les étapes qui requièrent davantage de caractérisation. Les DCs humaines peuvent être générées à partir de progéniteurs 'granulocyte-macrophage' (GMP, similaire) ou de progéniteurs lymphoïdes (MLP), lesquels proviennent originellement des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Dans le sang, les monocytes, les DCs myéloïdes (mDC) et les plasmacytoïdes (pDCs) sont des précurseurs putatifs des DCs lymphoïdes et des tissus. Les monocytes non-classiques sont rapportés pour se convertir en monocytes classiques chez la souris. Les DCs inflammatoires et les DCs CD14⁺ ont des profils transcriptionnels qui suggèrent qu'elles originent de monocytes alors que les DCs CD1c⁺ et les DCs CD141⁺ sont reliées à leur homologue dans le sang. Les DCs myéloïdes et les cellules de Langerhans (LCs) s'imbriquent dans les ganglions lymphatiques drainant la peau. Les DCs CD14⁺ et les pDCs sont retrouvées dans les ganglions, mais peuvent venir directement du sang plutôt que via la migration par les tissus.

Malgré qu'il soit clair qu'il existe des différences entre les DCs murines et les DCs humaines, il est évident que les DCs murines sont un modèle approprié pour les cellules humaines dans la plupart des cas. Comme chez l'humain, les DCs murines : 1) originent des cellules HSC CD34⁺ de la moelle osseuse, 2) sont retrouvées dans le sang et les tissus, 3) sont capables de capturer et dégrader les peptides antigéniques, 4) expriment des molécules du CMH de classe II complexées avec des peptides antigéniques, 5) expriment des molécules de co-stimulation, 6) mûrissent et migrent en réponse à des signaux de

danger, 7) peuvent répondre à l'environnement avoisinant en contrôlant la production de cytokines et chimiokines. Cependant, les données avec les DCs murines doivent toujours être interprétées avec soin, spécifiquement lorsqu'il est clair que des différences existent entre les DCs murines et leurs homologues humains.

3.5.1.3 Éléments clés de la maturation des DCs

Les DCs possèdent plusieurs propriétés qui les rendent parfaitement adaptées à la capture antigénique pour la présentation aux cellules T. En effet, elles forment un vaste réseau de surveillance sous les surfaces épithéliales qui sont les principaux sites d'entrée des pathogènes chez l'hôte. Brièvement, au stade 'immature' du développement, les progéniteurs des DCs dans la moelle osseuse deviennent des précurseurs mobiles qui se retrouvent dans les tissus, les surfaces muqueuses et les organes périphériques où elles interagissent en continu avec l'environnement pour échantillonner et capter des antigènes étrangers et migrer lentement aux ganglions lymphatiques (363). Sous ces conditions homéostatiques ou non-inflammatoires, les DCs, avec une forte capacité phagocytaire, expriment des niveaux faibles de molécules du CMH de classe II et de molécules de co-stimulation et il a été suggéré que leurs interactions avec les cellules T naïves soient impliquées dans la tolérance périphérique des lymphocytes T (392, 393). De plus, l'expression à la surface des molécules du CMH de classe II liées à un peptide sur les DCs immatures est éphémère et les molécules sont rapidement internalisées et dégradées dans les compartiments endosomiques, ce qui réduit l'interaction entre le CMH de classe II et l'antigène avec le récepteur des cellules T spécifique pour cet antigène. Cependant, si l'interaction a lieu, le faible niveau de molécules de co-stimulation et l'absence de production de cytokines appropriées telle que l'IL-12, ne permettent pas aux DCs immatures d'activer parfaitement les cellules T naïves et ces dernières peuvent tomber en anergie ou en apoptose. Ce mécanisme de tolérance périphérique évite ainsi une activation exagérée des cellules T dans une situation où les DCs sont en contact continu avec des antigènes du soi (394).

Toutefois, avant que ces DCs puissent activer efficacement les cellules T naïves, elles doivent suivre un programme de maturation qui peut être initié, par exemple, par l'exposition directe à des agents pathogènes. Après l'absorption d'antigènes, les DCs apprêtent ces antigènes pour leur présentation à la surface cellulaire via des molécules du

CMH. Comme il a été précédemment mentionné, les DCs sont armées d'un réseau de PRRs qui sont importants dans la détection de PAMPs et permettent de lancer l'alerte au système immunitaire. Bien que plusieurs types de cellules expriment les molécules du CMH de classes I et II nécessaires à la présentation de l'antigène, les DCs sont le type de cellules le plus apte à activer efficacement les cellules T naïves. Les DCs, suite à leur maturation, ont également la capacité d'exprimer un niveau élevé de molécules de co-stimulation et d'exprimer des récepteurs pour les chimiokines, tel que le 'C-C chemokine receptor type 7' (CCR7), qui permet aux DCs de migrer à partir de sites d'infection dans les tissus périphériques aux organes lymphoïdes secondaires pour induire l'activation et la différenciation des cellules T, en autres. Au cours de cette migration, les DCs sont soumises à un processus de 'maturation' qui entraîne plusieurs événements cellulaires.

3.5.1.3.1 Présentation de l'antigène par le CMH

Suite à la reconnaissance de PAMPs chez les DCs immatures par des récepteurs extra- ou intra-cellulaires, des mécanismes sont mis en place pour la capture des antigènes et favoriser ainsi l'apprêtement et la présentation de ces antigènes aux cellules T via les molécules du CMH. Le CMH joue un rôle central dans le développement des réponses immunitaires. En effet, l'éducation des cellules T via le CMH par les DCs permet une réponse plus ordonnée et spécifique.

Tout d'abord, les DCs peuvent utiliser les molécules du CMH de classe I pour présenter des antigènes principalement endogènes, c'est-à-dire, des antigènes qui sont présents dans le cytosol et qui sont soumis à des mécanismes de traitements cytosoliques qui composent la voie classique du CMH. Ainsi, les peptides dégradés sont générés dans le protéasome, transférés dans le réticulum endoplasmique via le transporteur TAP et chargés sur des molécules du CMH de classe I (363). Cependant, les antigènes exogènes peuvent également être présentés par des molécules du CMH de classe I dans certaines circonstances, en particulier dans le cas d'antigènes sous forme de particules. Plus précisément, après l'absorption phagocytaire ou l'endocytose, certains antigènes exogènes peuvent échapper au système vacuolaire, pénétrer dans le cytosol et accéder aux mécanismes de traitement classique de présentation antigénique via le CMH de classe I.

Dans le cas de molécules du CMH de classe II, les antigènes (tels que les bactéries extracellulaires) sont internalisés et ensuite dégradés dans les endosomes des DCs. Les DCs immatures accumulent constamment de nouvelles molécules du CMH de classe II dans des compartiments intracellulaires reliés aux lysosomes identifiés comme des compartiments riches du CMH de classe II (MIICs). Les peptides antigéniques générés sont également transportés dans le MIIC pour leur chargement sur de nouvelles molécules du CMH de classe II. Immédiatement après leur montage dans le réticulum endoplasmique, les molécules du CMH de classe II sont liées à la chaîne invariante (Ii), une protéine qui se lie au sillon de la liaison du peptide à la molécule du CMH de classe II. Ceci permet la conservation du CMH jusqu'à ce que les vésicules fusionnent avec les MIICs et que les peptides antigéniques soient introduits. Une fois que la vésicule du CMH de classe II fusionne avec les MIICs, les portions de Ii à l'extérieur du sillon de liaison de la molécule du CMH de classe II sont clivées par la cathepsine (Cath) pour libérer le CLIP ('class II-associated invariant chain peptide'). Au même moment, le HLA-DM, également retrouvé dans les MIICs, favorise l'élimination catalytique de CLIP et améliore la liaison des peptides aux molécules du CMH de classe II (363, 395). Toutefois, le chargement des antigènes peut également se produire en absence de la chaîne invariante (396). L'action de Cath sur les DCs immatures est régie par la cystatine (Cyst) qui inhibe le mécanisme de Cath (363). Après la maturation, Cyst est régulée à la baisse, ce qui libère Cath active. Finalement, dans les DCs immatures, les molécules de classe II sont rapidement internalisées et ont une courte demi-vie. Les stimuli inflammatoires reliés à la maturation mènent à une synthèse intensive des molécules de classe II ainsi que la translocation des complexes peptide-CMH de classe II à la surface des cellules où ils restent stables pendant plusieurs jours et sont disponibles pour une reconnaissance par les cellules T CD4+ (363, 397, 398).

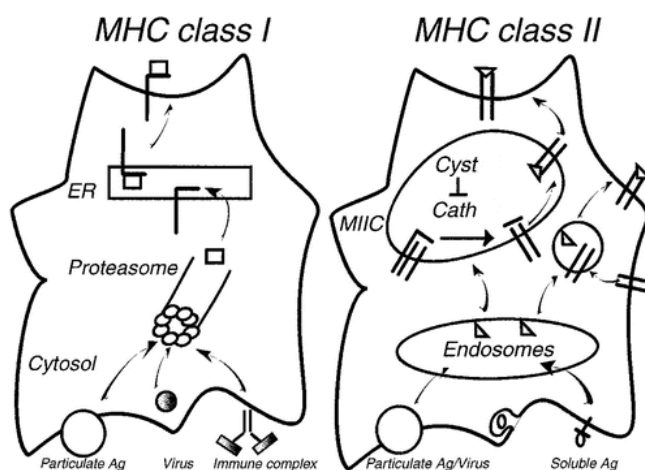


Figure 24. Traitement et présentation des molécules du CMH par les DCs (363).

Abbréviations:

Ag, antigène; Cath, cathepsine; Cyst, cystine; MIIC, compartiments riches en CMH de classe II.

3.5.1.3.2 Conséquences de la maturation des DCs

Après la rencontre et la reconnaissance du pathogène, les DCs deviennent très efficaces et présentent les antigènes aux cellules T auxiliaires (Th) dans les ganglions lymphatiques, qui à leur tour, régulent les effecteurs immunitaires, y compris les cellules B et d'autres cellules immunitaires. Ce processus coïncide avec l'expression accrue des molécules présentant les antigènes (CMH de classes I et II), les molécules de co-stimulations (telles que CD40, CD80 et CD86) ainsi que la production de cytokines par les DCs (dont l'IL-12, entre autre) (voir figure ci-dessous) (363). Pendant la migration, les DCs peuvent aussi interagir avec d'autres cellules immunitaires (éosinophiles, macrophages et cellules NK) par contact direct (cellule-cellule) grâce aux molécules de co-stimulation ou par la production de diverses cytokines (par exemple, les chimiokines CXCL1, CXCL9 et CXCL10) pour attirer des cellules inflammatoires au site de lésions tissulaires, pour développer une réponse inflammatoire (TNF- α , IL-1 et IL-6) ou pour réguler la réponse immunitaire (IL-12, IL-18, IL-23, et le 'transforming growth factor β ' [TGF- β]). Une fois dans les ganglions lymphatiques, les DCs terminent leur maturation et activent les cellules T, ce qui entraîne l'expansion des cellules T et leur différenciation. Ces cellules T effectrices migrent ensuite et peuvent atteindre les tissus lésés, car ils peuvent traverser l'épithélium ou l'endothélium enflammé. Des cellules Th CD4+ sécrètent diverses cytokines qui permettent

à leur tour l'activation d'autres cellules immunitaires. Les cellules T CD8+ cytotoxiques, elles, lysent éventuellement les cellules infectées (363).

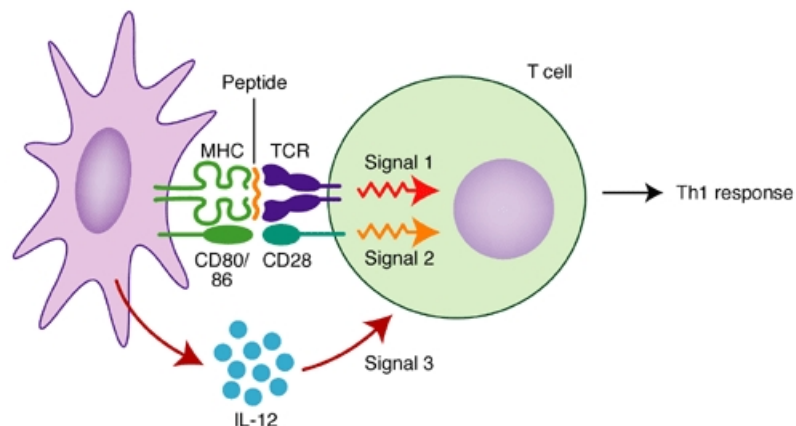


Figure 25. Exemple d'interactions entre les DCs matures et les lymphocytes T CD4+.

Adaptation d'une synapse immunologique entre les DCs et les cellules T CD4+.

Suite à l'activation et la maturation des DCs par des antigènes, les DCs procurent trois signaux aux cellules T CD4+ pour initier leur prolifération et leur différenciation. Le 'Signal 1' correspond aux complexes peptide antigénique/CMH de classe II à la surface des DCs reconnus par les TCRs sur les cellules T ainsi que l'expression de molécules de co-stimulation ('Signal 2') qui stimulent la prolifération des cellules T. La sécrétion de cytokines (IL-12) par les DCs ('Signal 3') est importante dans la différenciation finale des cellules T CD4+ en cellules Th1. La sécrétion d'autres cytokines peut influencer la polarisation dont l'IL-4 (vers une réponse Th2). (358)

Abbreviations : CMH, complexe majeur d'histocompatibilité; DC, cellule dendritique; Th, cellules T auxiliaires ou 'helper'; TCR, récepteur pour cellules T.

Les signaux reçus par les DCs décident non seulement si une réponse est justifiée mais aussi le type de réponse induite (24). Par extension, les cellules B s'activent après un contact entre les cellules T et les DCs, puis migrent dans les centres germinatifs où ils deviennent des plasmocytes produisant des Abs qui neutralisent le pathogène initial. Après l'interaction avec les lymphocytes, les DCs semblent mourir par apoptose (363). Les signaux reçus par les DCs et les conditions environnementales locales sont donc cruciaux pour dicter l'implantation de la tolérance ou de l'immunité (359). Finalement, les changements morphologiques qui accompagnent la maturation des DCs incluent une perte d'adhésion, la réorganisation du cytosquelette et l'acquisition d'une motilité cellulaire élevée (399). L'actine, un important contrôleur du remodelage du cytosquelette, est exprimée à des

niveaux élevés dans les DCs situés dans les zones de cellules T des ganglions lymphatiques (400).

3.5.1.4 Rôles des DCs lors d'une infection à GBS et à *S. suis*

Il est reconnu que les DCs interagissent avec plusieurs bactéries. Parmi les streptocoques, *S. pneumoniae* est celui le plus étudié (22, 401-405). Par exemple, une étude *in vitro* a indiqué que les bmDCs immatures, en contact avec *S. pneumoniae*, sont amenées à subir une maturation phénotypique (expression de molécules de co-stimulation et du CMH) et la sécrétion de cytokines telles que TNF- α , IL-6, IL-12 et IL-10 et la CPS ne semble pas interférer dans cette maturation (22). Des résultats similaires ont été également observés avec *Streptococcus mutans* (406). Les interactions entre les DCs et *L. monocytogenes* ou *N. meningitidis* sont totalement différentes (407). Tandis que *L. monocytogenes* est rapidement phagocyté par les DCs par un mécanisme dépendant du sérum, *N. meningitidis* est en grande partie protégé de la phagocytose par sa CPS (401). De plus, les principales cytokines sécrétées les DCs infectées avec *L. monocytogenes* sont IL-12 et IL-18, des cytokines capables de déclencher une réponse Th1, alors que *N. meningitidis* induit des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et TNF- α chez les DCs. L'activation des DCs par *L. monocytogenes* semble être largement régulée par le LTA. Concernant GBS et *S. suis*, aucune étude au début de ce projet de thèse n'avait abordé les interactions entre les DCs et ces streptocoques, encore moins le rôle de la CPS dans ces interactions. Par contre, chez les macrophages, GBS est rapporté pour y être internalisé et y survivre, ce qui n'est pas le cas avec *S. suis* (18, 94, 162, 408). Des études ont également démontré que ces deux streptocoques peuvent amener la production de cytokines par les macrophages dont TNF- α (3, 5, 211, 215, 336, 409), ce qui laisse suggérer que GBS et *S. suis* seraient aptes à activer les DCs.

3.5.2 Cellules 'natural killer' (NK)



Figure 26. Image par microscopie électronique à balayage d'une cellule NK détruisant une cellule cancéreuse (Cancer Foundation of West Tennessee (410)).

Les cellules NK sont des lymphocytes innés présents chez tous les mammifères et qui exercent de multiples fonctions. Ces cellules expriment plusieurs récepteurs à travers lesquels elles peuvent directement reconnaître les produits microbiens, les cellules aberrantes ou transformées (tumeurs où cellules infectées par des virus) et produire diverses cytokines (296, 411). Initialement, les cellules NK ont été décrites comme des cellules pouvant exercer leur rôle sans la nécessité d'être activées préalablement et étaient importantes dans la première ligne de défense face aux tumeurs. Cependant, plusieurs études indiquent maintenant que les cellules NK requièrent une éducation/maturation avant d'exercer leur activité cytotoxique (23, 296).

Depuis la dernière décennie, les cellules NK sont maintenant considérées comme des cellules sécrétrices de diverses chimiokines et cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α . De plus, il est reconnu que ces productions permettent l'activation et la mobilisation d'autres cellules du système immunitaire (412). Les précurseurs des cellules NK se retrouvent dans la moelle osseuse qui est le site principal du développement de ces cellules et lorsqu'elles atteignent leur pleine maturité, les cellules NK s'engagent dans différents tissus pour exercer leurs fonctions (413, 414). Elles constituent entre 5 et 15% des lymphocytes dans le sang périphérique chez l'humain (415). Ces cellules peuvent être distingués des autres lymphocytes (cellules T, NKT et B) par l'absence de TCR et de BCR à leur surface. Récemment, il a été démontré que les cellules NK pourraient initier une réponse mémoire comme les cellules T. En effet, certaines sous-populations peuvent se

développer et s'étendre, persister et engager une forte réponse secondaire contre des pathogènes rencontrés auparavant (416). Ces récentes découvertes repoussent donc les frontières établies entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ainsi, la mémoire immunologique ne semble plus être restreinte aux lymphocytes T et B. Cependant, cet aspect ne sera pas détaillé dans ce projet de thèse. En dépit des similitudes entre les fonctions des cellules T et des cellules NK, les cellules NK se développent normalement chez des souris sans thymus et donc en absence de cellules T et suggèrent que les cellules NK possèdent une voie de développement unique (417).

Ici, le développement et les sous-populations de cellules NK d'origine murine et humaine seront abordées dans les mêmes sections.

3.5.2.1 Développement des cellules NK

Plusieurs aspects clés du développement biologique des cellules NK se produisent dans la moelle osseuse au cours d'une phase nommée 'phase médullaire'. Il s'agit notamment de l'engagement de précurseurs hématopoïétiques de la lignée des cellules NK, de l'éducation des cellules NK immatures vers la tolérance, l'acquisition de récepteurs impliqués dans la reconnaissance de cellules cibles et l'établissement de la compétence fonctionnelle (418). Ces événements sont accompagnés de changements dans les phénotypes de la surface cellulaire permettant leur classification en stades distincts. La 'phase médullaire' est suivie d'une phase 'périphérique' où les cellules NK peuvent subir une différenciation ultérieure. Le résultat de ce processus résulte en des cellules NK matures avec une capacité cytotoxique ainsi qu'une capacité de sécréter des cytokines (419).

Des expériences *in vivo* ont indiqué chez la souris que seulement le progéniteur CLP donne naissance à des cellules NK (358, 417, 420). La maturation des cellules NK est caractérisée par des stades intermédiaires qui se différencient par l'expression de certains marqueurs. La figure suivante montre un aperçu des étapes importantes dans le développement des cellules NK.

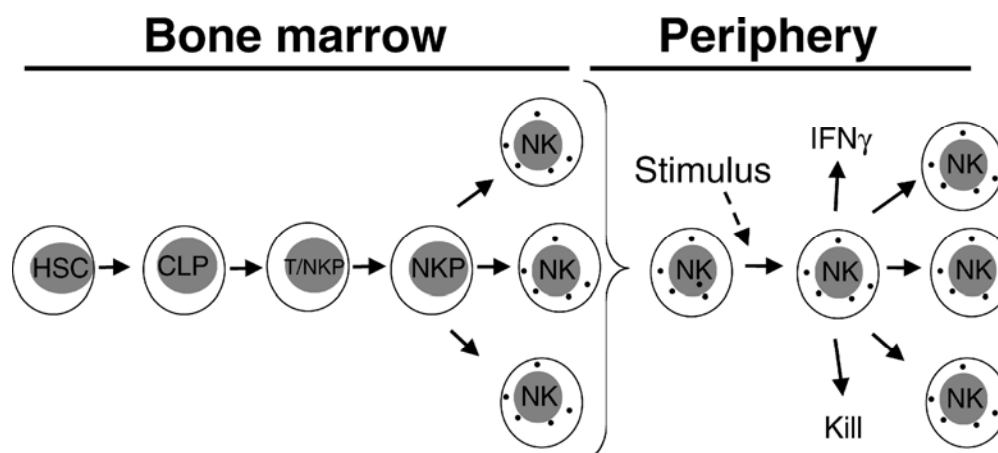


Figure 27. Cycle dynamique de la vie des cellules NK.

Version simplifiée du développement des cellules NK dans la moelle osseuse des cellules hématopoïétiques (HSC) en progéniteur lymphoïde commun (CLP), en progéniteur bipotentiel de cellules T et de cellules NK (T/NKP), en progéniteur de cellules NK (NKP) et finalement en cellules NK matures (417). Les cellules NK immatures prolifèrent durant le développement. En périphérie, les cellules NK sont généralement quiescentes, mais prolifèrent, induisent la mort cellulaire et produisent des cytokines suite à une stimulation.

Ainsi, la première étape du développement des cellules NK semble partager une voie commune avec d'autres lymphocytes impliquant la différenciation de HSCs en CLPs (417). La deuxième étape majeure implique la différenciation de CLPs à progéniteurs bipotentiels de cellules T et de cellules NK (T/NKP). Récemment, des études ont identifié certains marqueurs des T/NKPs dont CD27 et CD244 (421). L'acquisition de la molécule CD122 (chaîne β du récepteur pour l'IL-2) à la surface cellulaire marque la transition entre le T/NKP aux cellules NK. CD122 est une protéine essentielle dans la formation du récepteur pour la cytokine IL-15, une cytokine critique pour le développement des cellules NK (422). Ce récepteur sera exprimé tout au long des différents stades de développement des cellules NK autant d'origine humaine que murine. De plus, le passage du CLP et/ou T/NKP à NKP est régulé par l'activité transcriptionnelle de plusieurs facteurs spécifiques dont Gata3, T-bet and Eomes (412, 417). Chez l'humain, les étapes développementales des HSCs en NKPs ne sont pas encore bien comprises.

La quatrième étape implique la différenciation des NKPs (cellules NK immatures) en cellules NK phénotypiquement et fonctionnellement matures. Selon le modèle établi chez la souris (417, 423), la différenciation des NKPs se traduit par l'acquisition progressive de

récepteurs de cellules NK dont le CD161c (NK1.1 ou NKRP1C, un récepteur appartenant à la famille des lectines de type C) ainsi que le récepteur NKp46 (Ncr1). La présence du 'CXC chemokine receptor' (CXCR) 4 permet également de contenir les NKPs dans la moelle osseuse le temps de terminer leur maturation. La différenciation se poursuit par l'acquisition séquentielle de plusieurs récepteurs de surface comme CD94/NKG2A/C/E, NKG2D, Ly49 (récepteur reconnaissant les molécules du CMH) et DX5/CD49b et l'étape finale de la maturation est associée à l'augmentation de l'expression des molécules CD11b/Mac-1 et CD43. Les cellules NK les plus matures dans la moelle osseuse ressemblent en majorité aux cellules NK spléniques (424). Ces cellules quittent donc la moelle osseuse pour migrer en périphérie.

Chez l'humain, l'acquisition du marqueur CD56 est l'engagement définitif des cellules dans leur différenciation en cellules NK. CD56 est une glycoprotéine de la superfamille des Igs qui est exprimée sur la quasi-totalité des cellules NK. Une population de cellules NK CD56^{bright}, avec une capacité proliférative très élevée, peut se retrouver dans la moelle osseuse, dans le sang périphérique et dans les tissus lymphoïdes secondaires (425). Des études *ex vivo* ont montré que les cellules NK CD56^{bright} peuvent se différencier en cellules NK matures CD56^{dim} en réponse à une stimulation à l'IL-2 ou à l'IL-15 (426, 427). La transition entre ces deux étapes est largement inconnue. La maturation des cellules NK CD56^{dim} est marquée par la diminution d'expression du récepteur NKG2A ainsi que de la molécule d'adhésion CD62L alors que l'expression des récepteurs Fc CD16 et les 'killer immunoglobulin-like receptors' (KIRs, récepteurs homologues de Ly49 chez la souris) est augmentée (412). De récentes études ont également démontré la corrélation entre l'expression du marqueur CD57 et la maturation complète des cellules NK CD56^{dim} qui possèdent une fonction cytotoxique optimale (412, 428).

En périphérie, les cellules NK sont bien adaptées pour répondre rapidement aux cellules infectées ou transformées et jouent un rôle important dans la défense innée. Les cellules NK matures en périphérie se trouvent principalement dans le sang, la rate, le foie, les ganglions lymphatiques, le thymus ainsi que dans l'utérus et les intestins. Cependant, elles ne constituent qu'une petite population de cellules (environ 2,5% des cellules de la rate chez la souris) (417). L'attraction des cellules NK pour ces emplacements n'est pas bien caractérisée, mais ces cellules, durant leur développement, semblent avoir régulé l'expression d'un certain nombre d'intégrines pouvant jouer un rôle dans leur localisation

(429). De plus, plusieurs chimiokines, y compris CXCL12 et CCL3, ont été impliquées dans la localisation dirigée des cellules NK (417). La demi-vie des cellules NK matures dans la périphérie est entre 7 à 10 jours (430, 431). De plus, elles sont relativement quiescentes et prolifèrent peu (417). Comme mentionné précédemment, l'IL-15 semble jouer plusieurs rôles dans la vie des cellules NK tels que le développement des cellules NK, l'homéostasie et la survie en périphérie par le maintien de facteurs anti-apoptotiques (417, 430, 432).

3.5.2.2 Sous-populations de cellules NK

De toute évidence, les cellules NK ne sont pas homogènes et il existe suffisamment de preuves sur l'existence de sous-populations spécialisées chez la souris et chez l'homme. En particulier, tout au long de leur développement, les cellules NK sont hétérogènes dans leur phénotype, leur capacité prolifératrice et leurs fonctions (433).

Les cellules NK chez la souris sont principalement sous-divisées selon l'expression ou non de CD27, qui est un indicateur de leur stade de différenciation (424). Par contre, les cellules NK provenant de souris déficientes en CD27 montrent une différenciation normale des cellules NK, mais n'arrivent pas à exercer leurs fonctions suite à une stimulation (434). Comme mentionné précédemment, l'intégrine CD11b est un marqueur de maturation pour les cellules NK (autant chez la souris que chez l'humain). En conséquence, les cellules NK pourraient être représentées en quatre sous-populations basées sur l'expression de CD27 et de CD11b (435). Les cellules NK CD27⁻ sont considérées comme les cellules NK les plus matures. Les sous-populations CD27⁺ et CD27⁻ sont distribuées différemment dans les tissus. Par exemple, les cellules NK CD27⁻ sont la sous-population dominante dans le sang et la rate alors que les cellules NK CD27⁺ constituent la majeure population de cellules NK dans les ganglions lymphatiques (424, 435). Fonctionnellement, la sous-population CD27⁺ apparaît pour être plus réactive que la sous-population CD27⁻ dans la fonction cytotoxique, la production de cytokines et la prolifération des cellules NK. Les deux sous-populations expriment des niveaux similaires des récepteurs Ly49 et CD94/NKG2, mais les cellules NK CD27⁻ expriment plus fortement les récepteurs inhibiteurs Ly49, ce qui pourrait expliquer leur plus faible capacité cytotoxique. La cytotoxicité et la production de cytokines, deux fonctions typiques chez les cellules NK, ne sont pas aussi séparées en deux populations distinctes, comme c'est le cas chez l'humain (voir paragraphe ci-dessous). Les cellules NK CD27⁺ expriment des niveaux plus élevés du CXCR3 et ce récepteur pourrait être important

dans la distribution des principales deux sous-populations. Cependant, une petite population de cellules NK diffère phénotypiquement et fonctionnellement de celles retrouvées dans la rate et elle se retrouve plutôt dans le thymus. Ces cellules NK thymiques sont caractérisées par l'expression du récepteur CD127. Les cellules NK CD127+ sont phénotypiquement et fonctionnellement similaires aux cellules NK CD56^{bright} chez l'humain. En effet, ces cellules sont d'importantes productrices de cytokines, ont une très faible capacité cytotoxique et peuvent se retrouver dans les ganglions lymphatiques. CD127 a également été montré pour être sélectivement exprimé sur les cellules CD56^{bright} dans le sang humain périphérique.

Chez l'humain, les cellules NK du sang périphérique comportent deux sous-populations principales basées sur l'expression de CD56, c'est-à-dire, CD56^{dim} et CD56^{bright} (436). Les cellules NK CD56^{dim} sont la sous-population la plus prédominante dans le sang et possèdent une forte activité cytotoxique et sécrètent rapidement l'IFN- γ ainsi que d'autres cytokines et chimiokines sous l'activation de récepteurs (437). De plus, une large fraction des CD56^{dim} expriment CD16. Les cellules NK CD56^{bright} représentent une minorité dans le sang périphérique, mais sont davantage prédominantes dans les tissus. Leur capacité cytotoxique est faible et elles seraient plutôt responsables d'une production à long terme de cytokines et de chimiokines (principalement l'IFN- γ et le TNF- α) sous la stimulation d'IL-2 et d'IL-15. Les deux principales sous-populations de cellules NK CD56 diffèrent principalement dans leur expression de divers récepteurs dont les KIRs et CD94/NKG2A. Il a été récemment proposé que les cellules NK humaines pourraient être divisées aussi selon la présence ou l'absence du marqueur CD27. Les cellules NK seraient alors plutôt divisées en trois sous-populations, CD27 pouvant être exprimé ou non sur des cellules NK CD56^{bright} (438).

Malgré les différences, il a été suggéré que les cellules NK murines CD27+ corrélaient avec les cellules NK CD56^{bright} chez l'humain. Ceci est basé sur leur localisation dans les ganglions lymphatiques, sur leur grande capacité de sécréter des cytokines et de proliférer, et sur leur faible expression de récepteurs inhibiteurs pour les molécules du CMH de classe I. De plus, les cellules NK CD56^{bright} seraient moins différenciées que les cellules NK CD56^{dim}, ce qui serait analogue aux cellules NK CD27+ et CD27- chez la souris. Cependant, contrairement aux cellules NK CD56^{bright}, les cellules NK murines n'expriment pas CCR7 et CD62L est exprimé sur les deux sous-populations de cellules NK CD27 murines, au contraire des cellules NK humaines.

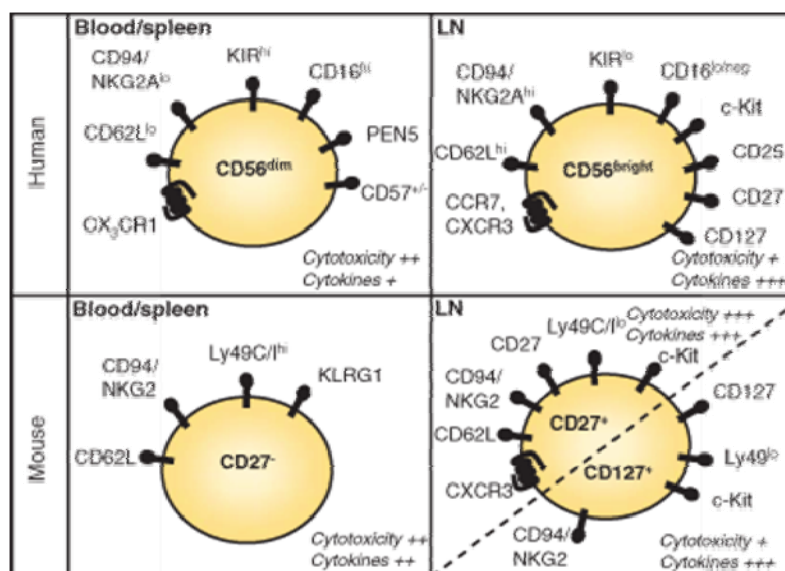


Figure 28. Version modifiée des principales sous-populations de cellules NK décrites chez l'humain et chez la souris.

Cette figure adaptée d'Inngjerdingen *et al.* montre la principale sous-population de cellules NK trouvée dans les organes indiqués et les phénotypes associés (439). Deux principaux phénotypes ont été décrits dans les ganglions lymphatiques chez la souris.

Abbreviations : LN, ganglions lymphatiques.

3.5.2.3 Fonctions des cellules NK

Les cellules NK ont été identifiées dans les années 1970 grâce à leur habileté à tuer des cellules tumorales sans activation préalable. Non seulement ces cellules exercent ce pouvoir cytotoxique sur plusieurs cibles telles que les cellules infectées par les virus, mais elles peuvent rapidement produire diverses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires impliquées dans les réponses inflammatoires aiguës (437). Notamment, lorsqu'activées, les cellules NK peuvent reconnaître plusieurs produits bactériens via leur TLRs, un évènement résultant à une rapide activité cytotoxique et la production de cytokines.

La fonction cytotoxique des cellules NK humaines est hautement régulée par une gamme de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Le système de détection des cellules NK comporte de nombreux récepteurs et l'engagement de ces récepteurs dicte la qualité et l'intensité de la réponse des cellules NK. Les cellules NK utilisent des récepteurs inhibiteurs pour mesurer l'absence de molécules du soi exprimées constitutivement sur des cellules

cibles. En interagissant avec des molécules du CMH de classe I qui sont exprimées constitutivement par la plupart des cellules saines, mais qui peuvent être perdues dans des conditions de stress (dont la présence de pathogènes infectieux), les récepteurs inhibiteurs constituent un moyen pour les cellules NK de rester 'tolérantes' à ces cellules saines tout en étant alerte aux cellules transformées. NKp46, NKp44 et NKp30, des 'natural cytotoxicity receptors' (NCRs) qui sont les principaux récepteurs activateurs. Les ligands pour ces récepteurs sont multiples et peuvent provenir de pathogènes ou de cellules. NKG2D, DNAN-1, CD16, CD244 et NTBA sont également d'autres récepteurs activateurs (437). Parmi les récepteurs inhibiteurs, un important rôle est joué par les KIRs qui reconnaissent les déterminants allotypiques des molécules HLA-A, HLA-B et HLA-C ainsi que CD94/NKG2A pour les molécules HLA-E (440). Il existe plusieurs différences entre les récepteurs de cellules NK murines et humaines. Chez la souris, les récepteurs inhibiteurs spécifiques pour les molécules du CMH de classe I sont les récepteurs de la famille Ly49. Bien que plusieurs récepteurs activateurs des cellules NK soient présents autant chez l'humain que chez la souris (dont CD16, NKp46, DNAM1 et NKG2D), les récepteurs NKp30 et NKp44 sont présents seulement chez l'humain (413, 436). Les cellules NK utilisent deux voies principales pour induire l'apoptose de cellules cibles: l'exocytose de granules (441) et l'engagement de récepteurs menant à la mort cellulaire (442) par la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) ou par les récepteurs FAS (24, 443). Il est important de mentionner que ces deux voies interagissent ensemble. Considérant que cette fonction des cellules NK ne sera pas abordée lors de ce projet de thèse, la description de ces voies ne sera pas détaillée.

Les cellules NK exercent leurs fonctions principalement dans les tissus ou dans les organes lymphoïdes secondaires où elles migrent durant une inflammation grâce à des facteurs chimiotactiques induits par exemple chez les cellules immunitaires infectées par des pathogènes envahisseurs (444, 445). De plus, les fonctions des cellules NK sont grandement influencées selon le microenvironnement (par le contact avec les autres cellules et les facteurs solubles) autant dans des conditions physiologiques que pathologiques (437). Aujourd'hui, les cellules NK ne sont plus considérées comme de simples machines à tuer. Au cours des dernières années, un nouveau concept est apparu indiquant que les cellules NK sont plutôt des sentinelles importantes du système immunitaire, travaillant comme premiers répondants et alertant l'hôte suite à la présence de micro-organismes infectieux. En particulier, plusieurs données ont mis en évidence le rôle

des interactions entre les cellules NK et d'autres cellules du système immunitaire inné et qui se produisent pendant les premières phases de l'inflammation aiguë. Il devient de plus en plus évident que les cellules NK influencent la réponse immunitaire adaptative via leurs interactions réciproques avec des APCs dont les DCs (ces interactions seront plus explicitement détaillées dans la prochaine section) et grâce à leur capacité à sécréter des cytokines et des chimiokines (419). Il est important de noter qu'au cours de cette interaction, les cellules NK potentialisent la maturation des DCs. Ce processus semble jouer un rôle crucial dans l'élaboration des réponses immunitaires innées et adaptatives (25). Comme mentionné ci-dessus, les cellules NK peuvent, en dehors de la fonction cytotoxique, favoriser la production d'un panel de cytokines. Lorsqu'activées, les cellules NK sécrètent de grandes quantités de cytokines dont l'IFN- γ , le TNF- α et le GM-CSF ainsi que de chimiokines telles que CCL3, CCL4, CCL5 et CXCL10 (23). De plus, les cellules NK peuvent aussi être activées par plusieurs cytokines et amener la régulation positive de marqueurs à leur surface dont le B220, le CD11c et le CD69 (419).

3.5.2.4 Rôle des cellules NK lors d'infection bactérienne : implication dans les infections à GBS et à *S. suis*

La récente découverte que les cellules NK peuvent exprimer des TLRs à leur surface a amené un nouvel intérêt pour ces cellules dans la réponse immune innée face aux infections bactériennes. Au contraire des phagocytes, l'activation des cellules NK par des PAMPs semble généralement se produire à l'aide d'autres cellules immunitaires qui offrent un microenvironnement en cytokines essentielles pour la réactivité des cellules NK (446). Chez l'humain, les cellules NK expriment l'ARNm codant pour les TLR1 à TLR9. TLR1, TLR2, TLR4 et TLR9 se retrouvent dans 10% de ces cellules (447, 448). Chez la souris, alors que les études semblent démontrer que tous les ARNm des TLRs sont exprimés chez les cellules NK, seulement TLR2, TLR4, TLR8 et TLR9 ont été trouvés exprimés à la surface (449, 450). D'autres PRRs ont aussi été décrits chez les cellules NK. Chez l'humain, les cellules NK expriment de hauts niveaux des récepteurs intracellulaires NOD2 et NLRP3 (451). Un rôle du récepteur Rig-I-like a également été suggéré (452). Il a été démontré que les cellules NK, toutes origines confondues, peuvent reconnaître certains PAMPs, comme l'OmpA chez *K. pneumonia* et le LTA de *S. aureus* via TLR2 ainsi que la flagelline d'*E. coli* par TLR5. Ces évidences démontrent que les cellules NK peuvent répondre à des ligands pour les TLRs et mener à leur activation par la production d'IFN- γ et l'expression de CD69,

un marqueur d'activation des lymphocytes (453-455). Une reconnaissance directe de *Mycobacterium bovis* et de *P. aeruginosa* par le récepteur NKp44 a aussi été rapportée (32, 456).

Le rôle des cellules NK dans les infections bactériennes a été clairement établi (449). Les cellules NK produisent différentes cytokines qui contribuent à l'environnement inflammatoire durant l'infection. L'IFN- γ et le GM-CSF sont les principales cytokines générées par les cellules NK, ce qui contribue à combattre l'infection. Plusieurs études ont identifiées les cellules NK comme la majeure source d'IFN- γ lors d'une infection bactérienne, en particulier chez des bactéries intracellulaires telles que *Francisella tularensis*, *L. monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* et l'espèce *Mycobacterium* (446, 449, 457-460). Les cellules NK ont été rapportées pour être la source dominante d'IFN- γ dans le cerveau ou les poumons durant une méningite ou une pneumonie causée par *S. pneumoniae* (455, 461, 462).

Malgré le rôle bénéfique des cellules NK sur la réponse immune grâce à leur production d'IFN- γ , l'activation des cellules NK n'est pas nécessairement bénéfique pour l'hôte. En effet, la résistance des souris dans un modèle d'infection à *S. pyogenes*, souris déplétées *in vivo* en cellules NK, était associée à des niveaux d'IFN- γ plus faibles durant la phase aiguë de l'infection (463). Cette observation a suggéré que les cellules NK pourraient jouer un rôle dans l'exacerbation de la pathologie des maladies causées par *S. pyogenes*. Un rôle protecteur de l'IFN- γ a été montré dans un modèle d'infection de GBS de types III et V chez la souris, mais aucune donnée n'est disponible concernant le rôle *in vivo* des cellules NK dans la production d'IFN- γ , ni leur importance lors d'une infection à GBS (464). Même s'il est connu qu'une forte production d'IFN- γ lors d'une infection à *S. suis* de type 2 est observée dans un modèle d'infection chez la souris (212), aucune donnée n'est disponible sur le rôle d'IFN- γ dans l'immuno-pathologie des maladies causées par *S. suis*, ni l'importance des cellules NK. Finalement, la capacité de GBS et de *S. suis* à activer directement les cellules NK n'a pas été non plus évaluée.

3.5.3 Interactions entre les DCs et les cellules NK

Depuis quelques années, il est devenu clair que les réponses immunitaires innées et adaptatives sont étroitement imbriquées. En effet, non seulement les cellules T CD4+, mais également d'autres cellules peuvent fournir de l'aide à la maturation des DCs, et par conséquent, favoriser une immunité efficiente. En particulier, les cellules NK ont le potentiel d'influencer les interactions à la fois innées et adaptatives des DCs et vice versa (23). L'étude publiée par Shah *et al.* en 1985 a été la première à mettre en évidence les interactions entre les DCs et les cellules NK (465). En 1999, il a été découvert que des fonctions effectrices des cellules NK sont favorisées par un contact direct avec les DCs activées (466). Depuis, plusieurs études ont fourni des preuves supplémentaires du rôle des interactions ('crosstalk') entre les DCs et les cellules NK lors de la surveillance du système immunitaire face à des pathogènes et des tumeurs (23, 24). Plus précisément, les DCs seraient également importantes pour l'activation, l'expansion et le maintien des cellules NK pendant les infections bactériennes (449, 467).

Cette coopération particulière permet le développement d'une réponse innée efficace grâce à l'activation des cellules NK via les DCs et d'une réponse immunitaire adaptative puissante par le biais de la maturation optimale des DCs par les cellules NK. En effet, ce dialogue pourrait influencer le développement d'une réponse Th1 et la mobilisation de cellules T cytotoxiques, une réponse essentielle pour une réponse antibactérienne, entre autre. Malgré que les signaux initiaux semblent provenir principalement des DCs, certaines études montrent la possibilité que les cellules NK puissent être les initiateurs de la réponse immune, et ce, en raison de la présence de TLRs à leur surface (24). Contrairement aux DCs, le rôle des cellules NK comme initiateurs de l'immunité reste à caractériser (24). Ces interactions ont été remarquées autant en présence de cellules tumorales, de DCs infectées par des virus ou des DCs infectées par des bactéries. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés plus attentivement aux interactions entre les DCs et les cellules NK dans un contexte d'infection bactérienne.

3.5.3.1 Impact des signaux dans les interactions DCs-cellules NK

Les capacités fonctionnelles de différentes cellules du système immunitaire inné et leur capacité à interagir avec d'autres cellules sont la preuve d'un réseau remarquable

formé par diverses cellules immunitaires. Ce réseau, grâce aux interactions directes entre les cellules et la libération de cytokines, permet de contrôler non seulement la force et la qualité des réponses innées mais aussi les réponses subséquentes du système immunitaire adaptatif (468). Plus précisément, de nombreuses études indiquent que l'activation *in vitro* des cellules NK induite par les DCs nécessite l'action synergique de plusieurs cytokines et d'un contact direct entre les DCs et les cellules NK (23, 24, 386, 468).

3.5.3.1.1 Rôle des cytokines

Les cytokines jouent un rôle important dans l'activation des DCs et/ou des cellules NK. Différents types de stimulation microbienne et l'activation de TLRs chez les DCs peuvent induire la production d'un certain nombre de cytokines qui activent les cellules NK. Un exemple est l'IL-12, un facteur clé responsable de la polarisation des cellules T en une réponse Th1, qui favorise aussi la survie des cellules NK, leur fonction cytotoxique et la production d'IFN- γ (469). Des études *in vitro* ont démontré le rôle central de l'IL-12 dans l'induction de la production d'IFN- γ par les cellules NK dans différents systèmes (23, 24). Comme mentionné précédemment, les DCs produisent l'IL-12 en réponse à une grande variété de pathogènes et de ligands et cette production est impliquée dans l'activation des cellules NK (23, 470). Il a été proposé qu'une exposition des cellules NK à l'IL-4 puisse également dévier la réponse adaptative ultérieure vers un état de tolérisation, la génération d'une réponse Th2 ou de cellules T non polarisés. En fait, à court terme, l'exposition des cellules NK à l'IL-12 favorise la libération des niveaux élevés d'IFN- γ et de TNF- α ainsi que l'acquisition de la fonction cytotoxique tandis que l'exposition à l'IL-4 résulte d'une faible production de cytokines et une faible activité cytotoxique (471). Ainsi, dans un scénario *in vivo* dans lequel l'IL-4 est libérée au début d'une réponse immunitaire innée (par exemple, par les mastocytes), le micro-environnement des cellules NK pourrait les dévier de leur rôle fonctionnel d'induire une polarisation Th1 (472). Ce scénario reste encore aujourd'hui à être démontré.

L'IL-18, un membre de la famille IL-1, est une autre cytokine produite par les DCs en réponse à un certain nombre de facteurs microbiens (473). Cette cytokine est surtout connue pour son aptitude à agir en tant que co-stimulateur avec l'IL-12 pour l'induction d'IFN- γ , car l'IL-18 seule est un faible inducteur et ce duo est connu pour améliorer les fonctions des cellules NK (474-476). L'IL-1 β peut également avoir un effet synergique avec

l'IL-12, mais les capacités de co-stimulation de l'IL-18 avec l'IL-12 semblent être plus puissantes. D'autre part, la synergie potentielle d'IL-18 et d'IL-23 favoriserait la prolifération de cellules NK de façon indépendante de l'IL-12 (477). Les cellules NK peuvent également être activées par l'IL-2 seule provenant des DCs, mais un contact direct avec les cellules NK pour la libération d'IFN- γ semble nécessaire (23).

Un certain nombre d'études *in vitro* ont également démontré un rôle important pour les IFNs de type 1 induits par les DCs infectées ou via des ligands pour les TLR4, TLR7, TLR8 et TLR9 et favoriseraient l'activation des cellules NK, soit directement, soit par l'induction autocrine de l'IL-15 (23, 24, 470, 478). De plus, les IFN α/β peuvent moduler l'expression de ligands pour le récepteur NKG2D chez les cellules NK. Un rôle paracrine d'IL-15 liée à la membrane cellulaire des DCs a été récemment rapporté dans la prolifération des cellules NK (24). L'IL-15 sécrétée provenant des DCs augmente aussi *in vitro* la prolifération des cellules NK (23, 479). En plus d'induire l'activation des cellules NK, les DC matures induisent leur recrutement aux ganglions lymphatiques de façon dépendante du récepteur pour chimiokines CXCR3 via la sécrétion, entre autre, de CXCL10 et de CXCL9 (24, 480). Les cellules NK peuvent également migrer en réponse à plusieurs chimiokines, y compris le CCL2, le CCL3 et le CCL5 (480). Cependant, les résultats obtenus avec les chimiokines CCL ne font pas consensus dans la littérature scientifique.

Comme il a été rapporté précédemment, les cellules NK produisent des cytokines qui contribuent à l'environnement cellulaire lors d'une infection inflammatoire. L'IFN- γ , le GM-CSF et le TNF- α sont les principales cytokines produites par les cellules NK activées (446). Ces cytokines sont reconnues pour avoir un effet activateur sur plusieurs cellules immunitaires dont les DCs et les macrophages. Les cellules NK peuvent également générer d'autres cytokines telles qu'IL-10 et le TGF- β . De même, les cellules NK sont la source de plusieurs chimiokines telles que CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 et CXCL10 (446). Elles sont donc aptes à activer et à attirer plusieurs types de cellules, y compris les DCs et d'autres cellules NK.

3.5.3.1.2 Rôle du contact cellule-cellule

Le contact direct entre les cellules joue également un rôle important dans les interactions entre les DCs et les cellules NK. En effet, les cellules NK activées réussissent

seulement à induire la maturation des pDCs lorsque les cellules sont physiquement en contact étroit (386). Borg *et al.* ont observé que les cellules NK et les DCs forment une synapse dite immunologique impliquant un réarrangement du cytosquelette et la mobilisation de radeaux lipidiques chez les DCs (481). La formation de cette synapse permet la sécrétion polarisée d'IL-12 par les DCs en direction des cellules NK. Des résultats similaires ont été rapportés pour l'IL-18. L'exigence du contact direct entre cellules est susceptible de refléter l'implication de plusieurs récepteurs et de leur ligand membranaire et/ou la nécessité de la sécrétion locale de cytokines à haute concentration à l'interface entre les DCs et les cellules NK (23). Bien qu'elles soient de faibles productrices de cytokines, les DCs immatures expriment constitutivement les molécules CD48 et CD70 qui sont des ligands pour les récepteurs 2B4 et CD27 chez les cellules NK, respectivement. Ces molécules peuvent améliorer la fonction des cellules NK et pourraient participer à leur activation induite par les DCs immatures. Les DCs matures, en plus de produire la plupart des cytokines activatrices des cellules NK, régulent à la hausse l'expression de molécules de co-stimulation à la surface cellulaire et, en fonction des stimuli reçus, pourraient également exprimer des ligands pour les récepteurs activateurs des cellules NK. Par exemple, l'expression de ligands pour le récepteur activateur NKG2D (MICA et/ou MICB) est régulée positivement chez les DC humaines après une exposition à l'IFN α/β (482). Fait intéressant, les DCs matures régulent à la baisse l'expression de CLRB, un ligand pour les récepteurs inhibiteurs NKR-P1B et NKR-P1D. Ces récepteurs seraient sensibles à l'absence ou à une expression altérée des molécules du CMH de classe I chez les cellules, ce qui pourrait rendre ces cellules sensibles à l'attaque des cellules NK (483). Il reste possible, et en fait probable, que l'expression de ligands pour des récepteurs supplémentaires chez les cellules NK pourrait changer au cours de la maturation des DCs, ajoutant davantage de complexité aux multiples interactions entre les DCs et les cellules NK (24).

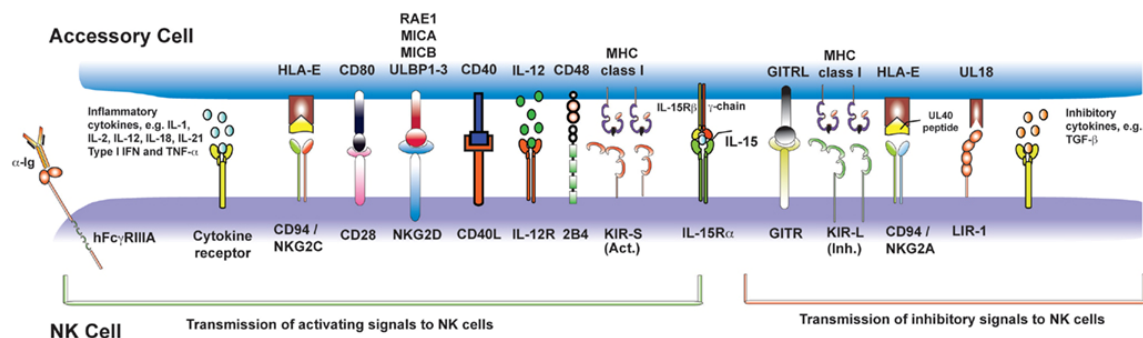


Figure 29. Principaux récepteurs impliqués dans les interactions entre les DCs et les cellules NK.

Cette figure donne un aperçu des récepteurs impliqués dans les interactions entre les cellules dendritiques et les cellules natural killer (NK) où leur implication a été démontrée expérimentalement et cette liste n'est pas exhaustive (467). À gauche se trouvent les récepteurs impliqués dans l'activation, alors qu'à droite, se trouvent les récepteurs impliqués dans l'inhibition des cellules NK.

3.5.3.2 Activation des cellules NK par les DCs

Les cytokines sécrétées par les DCs suite à leur maturation sont des facteurs importants pour l'activation des fonctions des cellules NK (484). Comme mentionné précédemment, *in vitro*, IL-12/IL-18, IL18/IL-23, IL-15 et IFN- α/β sécrétées par les DCs activées améliorent la production d'IFN- γ par les cellules NK, leur prolifération ainsi que leur potentiel cytotoxique (23, 477). D'autres études mentionnent également qu'IL-12 améliore l'expression des marqueurs d'activation CD69 et CD25 à la surface des cellules NK et seulement l'IL-18 favorise le développement d'un type unique de cellules NK auxiliaires qui expriment aussi le CD83, le CCR7 et le CD25 (386). L'effet de l'IL-18 est de rendre cette sous-population de cellules NK capable de migrer vers les compartiments lymphoïdes secondaires où ils peuvent directement influencer la polarisation Th1.

Les cellules NK sont sélectivement activées par des sous-populations de DCs afin de libérer l'IFN- γ et pour proliférer/survivre. Par exemple, il a été montré que les pDCs favorisent une prolifération sélective d'une sous-population de cellules NK dans le sang. Par ailleurs, les pDCs induisent l'expression de CD69 à la surface des cellules NK et améliorent la fonction cytotoxique des cellules NK (386). Les DCs dérivées de monocytes apparaissent comme un sous-type de DCs humaines le plus puissant pour stimuler, non seulement la

prolifération des cellules NK, mais aussi la cytotoxicité contre des cellules cibles. Les DCs 'interdigitating' (iDCs) sont intermédiaires dans la stimulation de la prolifération des cellules NK, la cytotoxicité et l'augmentation de l'expression de CD56 (484). Bien que les cytokines jouent un rôle dominant dans l'activation des cellules NK humaines, l'IFN- α a également été décrite pour moduler l'expression de ligands pour le récepteur NKG2D sur les LCs et les iDCs et ces molécules activeraient les cellules NK de façon dépendante du contact (484). Les interactions dépendantes du contact cellulaire comprennent également des molécules d'adhésion telle que l'interaction LFA1/ICAM1 qui est importante pour l'activation des cellules NK par les DCs. Comme mentionné précédemment, les interactions entre CD70/CD27, CD48/2B4 mais aussi CLRB-NKR/P1B ou NKR/P1D semblent être impliquées dans ce phénomène (24). Pour conclure cette section, la figure suivante récapitule les principales composantes de l'activation des cellules NK par les DCs.

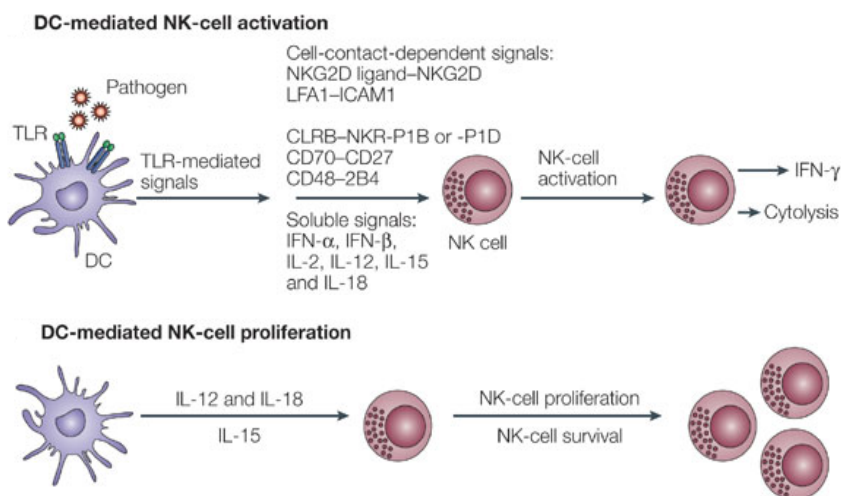


Figure 30. Vue d'ensemble schématique de l'activation des cellules NK médiée par les DCs ainsi que la survie/prolifération des cellules NK.

Les cellules dendritiques (DCs) peuvent affecter les fonctions des cellules natural killer (NK) en induisant l'activation et/ou la prolifération des cellules NK (24). Les interactions entre les DCs et les cellules NK peuvent être dépendantes du contact ou de facteurs solubles comme les cytokines.

3.5.3.3 Maturation des DCs par les cellules NK

Des études ont démontré que durant la phase innée de la réponse immunitaire, la maturation des DCs peut être également influencée par les cellules NK (470, 484). Fait important, les cellules NK activées induisent la maturation des DCs directement ou en synergie avec des niveaux sous-optimaux de signaux microbiens (23). Il a été démontré que les cellules NK humaines activées peuvent augmenter la production de cytokines par les DCs immatures lorsque le ratio NK/DC est faible (1:5) (470). Dans ce contexte, les facteurs solubles tels que $\text{TNF-}\alpha$ et $\text{IFN-}\gamma$ ainsi que des contacts cellulaires directs sont nécessaires pour l'activation des DCs par les cellules NK. Les cellules NK peuvent induire la maturation de nombreuses sous-populations de DCs (pDCs entre autre) (23).



Figure 31. Aperçu schématique de la maturation des DCs par les cellules NK.

Les cellules natural killer peuvent affecter la maturation des cellules dendritiques en induisant la production de facteurs solubles comme les cytokines (24).

3.5.3.4 Lieux des interactions DCs-cellules NK

In vivo, les interactions entre les DCs et les cellules NK peuvent se produire dans les organes lymphoïdes ainsi que dans les tissus non lymphoïdes et leurs conséquences sont multiples (23). Comme il a été mentionné précédemment, les DCs sont réparties dans tous les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes et les cellules NK matures sont présentes dans la circulation sanguine et dans plusieurs tissus (23).

3.5.3.4.1 Dans les tissus périphériques

Lors de leur première rencontre dans les tissus périphériques (site d'infections bactériennes ou dans les tissus inflammés), le 'crosstalk' entre les DCs et les cellules NK a été proposé pour jouer un rôle important dans les mécanismes conduisant à la sélection des DCs ayant une capacité maximale de perpétuer la réponse immunitaire (485). La présence d'IL-12, suite à la maturation des DCs en contact avec des antigènes, favoriserait la

production d'IFN- γ par les cellules NK et ses fonctions diverses (485). Plusieurs chimiokines induites au cours du processus inflammatoire ont la capacité de recruter des cellules NK. Par exemple, les cellules NK, qui possèdent le récepteur CXCR3, peuvent être attirées aux sites d'infection grâce à la production des chimiokines CXCL9 et CXCL10 par les DCs, entre autre (24). Fait intéressant, les cellules NK réagissent non seulement aux chimiokines CCL3 et CCL5, mais sont également capable de les produire, ce qui leur permettrait de recruter elles-mêmes d'autres cellules inflammatoires aux sites de la réponse immunitaire (444). Ainsi, les cellules NK sont capables de se diriger vers les tissus inflammés où ils peuvent rencontrer les DCs résidentes des tissus périphériques ou celles recrutées suite au processus inflammatoire (484).

3.5.3.4.2 Dans les organes secondaires lymphoïdes

La rate et les ganglions lymphatiques sont d'autres sites importants où les DCs et les cellules NK peuvent entrer en contact. Les cytokines, qui sont produites par les DCs matures mobilisées dans les ganglions par exemple, peuvent activer les cellules NK résidentes et favoriser leur prolifération. En effet, les cellules NK co-localisent avec des DCs dans les régions de cellules T dans les ganglions lymphatiques humains (479). Le regroupement de cellules NK est habituellement situé dans les régions parafolliculaires de la zone des cellules T, c'est-à-dire, où les DCs matures se retrouvent en nombre accru après l'activation en périphérie (484). Parmi les cytokines produites par les cellules NK lors de l'interaction avec les DCs, la libération d'IFN- γ apparaît comme un facteur clé de la réponse immunitaire adaptative subséquente (24). En effet, cette production est extrêmement rapide et totalement dépendante de l'IL-12 produite par les DCs (479). Par conséquent, les cellules NK jouent un rôle central régulateur lors des interactions entre les DCs et les cellules T et la polarisation ultérieure qui a lieu dans les régions des cellules T dans les organes lymphoïdes secondaires. Dans certaines conditions d'activation, par exemple *in vitro*, les cellules NK peuvent exprimer des molécules telles que CD80, CD86 et OX40L qui permettent l'activation des cellules T directement (24, 486). Néanmoins, leur contribution à la co-stimulation directe des cellules T *in vivo* reste à démontrer (24).

3.5.3.5 Interactions DCs-cellules NK dans la réponse immune à une infection bactérienne : GBS et *S. suis*

Au début de ce projet de thèse, aucune étude ne s'était intéressée au rôle des interactions entre les DCs et les cellules NK, lesquelles pourraient représenter une importante et rapide source d'IFN- γ durant les infections bactériennes, en particulier chez les streptocoques. Chez GBS, il a été montré qu'IL-12 et IL-18 ont des effets thérapeutiques en augmentant la production d'IFN- γ chez les cellules immunitaires (487-489). De plus, une étude antérieure a montré que les macrophages péritonéaux et les cellules dérivées de la moelle osseuse provenant de souris avec un déficit immunitaire combinée élevé ('severe combined immunodeficiency') infectées séparément avec GBS de type III ne produisent pas d'IFN- γ . Lorsque ces cellules sont mises en co-culture, l'IFN- γ est produit en présence de GBS. Cependant, ces cultures contenaient environ 40% de cellules ayant le marqueur NK1.1, un marqueur de surface retrouvé uniquement sur les cellules NK et NKT, et ne permettait pas de déterminer clairement l'importance des cellules NK dans cette production d'IFN- γ (490). L'utilisation d'un système davantage raffiné est requis pour confirmer ces interactions entre les macrophages et les cellules NK. En ce qui concerne *S. suis*, aucune donnée n'était disponible concernant de possibles interactions entre deux types cellulaires du système immunitaire innée. Par contre, les interactions entre les DCs et les cellules NK ont été rapportées avec d'autres pathogènes. Par exemple, le contact direct entre les DCs et les cellules NK est requis dans le contexte d'infection à *L. monocytogenes*, mais les mécanismes de ce contact direct ne sont pas caractérisés (491). Le contact direct entre les DCs et les cellules NK en présence de LPS est nécessaire pour activer la fonction cytotoxique des cellules NK (470). Également, le contact direct entre les DCs et les cellules NK stimulées avec des lipoprotéines de *S. aureus* est également important dans la production d'IFN- γ par les cellules NK alors que les facteurs solubles, tels que les cytokines, contribuent que partiellement à l'activation des cellules NK. La prolifération des cellules NK a également été observée en présence de DCs stimulées par la flagelline (455). Finalement, une autre étude a montré que *M. bovis* est capable d'induire l'activation simultanée des cellules NK et des APCs via TLR2, ce qui favoriserait l'amorçage ultérieure des réponses de type Th1 (492).

III – MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

ARTICLE I**"Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells"**

Paul Lemire, Marie-Pier Lecours, Mathieu Houde, Nahuel Fittipaldi and Mariela Segura.

Publié dans: *Microbes Infect.* **2012** Oct;14(12):1064-1076.

DOI: 10.1016/j.micinf.2012.05.015.

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

Je suis le premier auteur de l'article. J'ai participé activement au design expérimental, aux expériences, à l'analyse des résultats et à l'écriture de l'article.

Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells

Paul Lemire¹, Marie-Pier Lecours¹, Mathieu Houde¹, Nahuel Fittipaldi² and Mariela Segura^{1*}.

¹Laboratory of Immunology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada; ²Center for Molecular and Translational Human Infectious Diseases Research, The Methodist Hospital Research Institute, 6565 Fannin, Houston, Texas 77030, US

Running title : GBS interactions with dendritic cells

Keywords : Group B *Streptococcus*; capsular polysaccharide; phagocytosis; cytokines; dendritic cells

* Corresponding author. Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada. Tel.: +1 450 773 8521, ext. 0080; fax: +1 450 778 8108.

Abstract

Group B *Streptococcus* (GBS) type III is an important agent of life-threatening invasive infections. Albeit the immune system plays a dual role in development and protection against disease, mechanisms leading to an efficient immune response against GBS remain obscure. Mouse bone marrow-derived dendritic cells (DCs) and primary spleen DCs were used to evaluate GBS capacity to modulate the functions of these important antigen-presenting cells. The role of capsular polysaccharide (CPS), one of the most important GBS virulence factors, in bacterial-DC interactions was evaluated by using a non-encapsulated mutant. Phagocytosis assays, confocal and electron microscopy showed that DCs efficiently internalize encapsulated GBS, but the latter possesses strong intracellular survival capacity. GBS devoid of CPS was internalized and killed at higher and faster rates than encapsulated GBS early after infection. Among several cytokines tested, GBS internalization was required for modulation of IL-12, IL-10 and CXCL10 pathways. In contrast, GBS induced DC expression of co-stimulatory molecules in a phagocytosis-independent manner. Finally, the production of pro-inflammatory and Th1 cytokines by GBS-stimulated DCs was differentially modulated by CPS expression, depending on DC origin. Our data suggest multiple mechanisms involved in GBS modulation of DC functions, which were selectively regulated by the presence of CPS.

Abbreviations

Ab	antibody	GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
APC	antigen-presenting cell	IL	interleukin
bmDC	bone marrow-derived dendritic cell	LAMP-1	lysosomal-associated membrane protein-1
CFU	colony-forming unit	LDH	lactate deshydrogenase
CM	chloramphenicol	MHC	major histocompatibility complex
CPS	capsular polysaccharide	MOI	multiplicity of infection
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand	PE	phycoerythrin
CXCR	C-X-C chemokine receptor	SEM	scanning electron microscopy
DC	dendritic cell	Siglecs	sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	TEM	transmission electron microscopy
FACS	fluorescence-activated cell sorting	Th	T helper
FITC	fluorescein isothiocyanate	TLR	Toll-like receptor
GBS	Group B <i>Streptococcus</i>	TNF	tumor necrosis factor
		WT	wild-type

Introduction

Group B *Streptococcus* (GBS) or *Streptococcus agalactiae* is the main cause of life-threatening invasive bacterial infections in pregnant women and newborns in North America and Western Europe (1). Clinical manifestations of GBS infection are mainly associated with pneumonia, septicemia, and meningitis. GBS is also increasingly associated with invasive disease in nonpregnant adults, especially among the elderly and individuals with underlying chronic illnesses (2). Like many pathogenic bacteria, clinical isolates of GBS are covered by a capsular polysaccharide (CPS) recognized as the most important factor for bacterial survival within the host (3). Among ten GBS capsular types that have been characterized (1, 2), type III GBS is the most common type in GBS meningitis (1). A cohort study suggested that the high invasiveness of this serotype may be related, at least in part, to inadequate maternal and infant levels of type III CPS-specific antibodies (4).

The structures of most GBS CPS types are formed by different arrangements of the monosaccharides glucose, galactose and N-acetylglucosamine into a unique repeating unit which contains a terminal sialic acid (Neu5Ac). The GBS terminal sialic acid capsular component mimics carbohydrate epitopes widely displayed on the surface of mammalian cells (3). It was thus suggested that the sialic acid containing-CPS might be involved in immune evasion by decreasing immune recognition as a result of molecular mimicry of host epitopes and/or decreasing access of host pattern recognition receptors to cell wall components hidden beneath the CPS (5). Nevertheless, conflicting data exist on the relative ability of encapsulated vs non-encapsulated strains to induce pro-inflammatory events by monocytes/macrophages or neutrophils (5-8). Furthermore, it has been reported that encapsulated and non-encapsulated GBS are equally susceptible to macrophage uptake. As such, the role of CPS in phagocytosis resistance versus evasion of immune cell killing remains uncertain (8). Effective uptake and killing of encapsulated GBS by these cells might require opsonization of the bacterium by specific antibodies and/or complement. Most studies have heretofore focused on opsonic and non-opsonic phagocytosis or killing of GBS by macrophages and neutrophils (8). By contrast, the interactions of GBS with dendritic cells (DCs) and the consequences of such interactions in the development of a specific immune response, including DC maturation and activation, have not been explored in detail.

Different types of leukocytes fulfill specialized tasks in antigen presentation and killing of pathogens (9). DCs primary function is to alert the immune system, not to clear invading microorganisms. In fact, DCs are recognized as the most powerful antigen-presenting cells (APCs) that initiate immune responses against pathogens and are considered an essential link between innate and adaptive immunity. DCs capture and process antigens, and then undergo a maturation process characterized by the production of cytokines and up-regulation of co-stimulatory molecules. Afterwards, DCs migrate to adjacent lymphoid organs where they activate T cells (10). In lymphoid tissues, conventional CD11c⁺ DCs comprise CD8 α ⁺ and CD8 α ⁻ subsets, which have distinct efficiencies of various antigen presentation pathways (11). The CD8⁺ DC subset has in common with other DCs the ability to take up exogenous antigens and to process these for presentation on MHC class II. However, the CD8⁺ DCs also have antigen handling specializations that distinguish them from their CD8⁻ DC neighbors. Whereas this major DC subpopulation of CD8⁻ cells are more efficient at capturing particulate antigens, the CD8⁺ DCs appear more efficient in loading exogenously-derived protein antigens onto MHC class I molecules, a pathway called cross-presentation (11). Consequently, the interactions between DCs and pathogens can strongly influence the outcome of a disease, and more importantly the magnitude and phenotype of the ensuing adaptive immune response to the invading pathogen. Thus, in this study, we used C57BL/6 mouse bone marrow-derived DCs (bmDCs) and spleen DCs to investigate their interactions with GBS type III in order to compare bacterial internalization and intracellular survival and the capacity of GBS to induce DC maturation and activation. The role of CPS in these processes was evaluated using an isogenic non-encapsulated mutant. Our results suggest that GBS-stimulated DCs were differentially modulated by the presence of CPS depending on DC origin.

Materials and methods

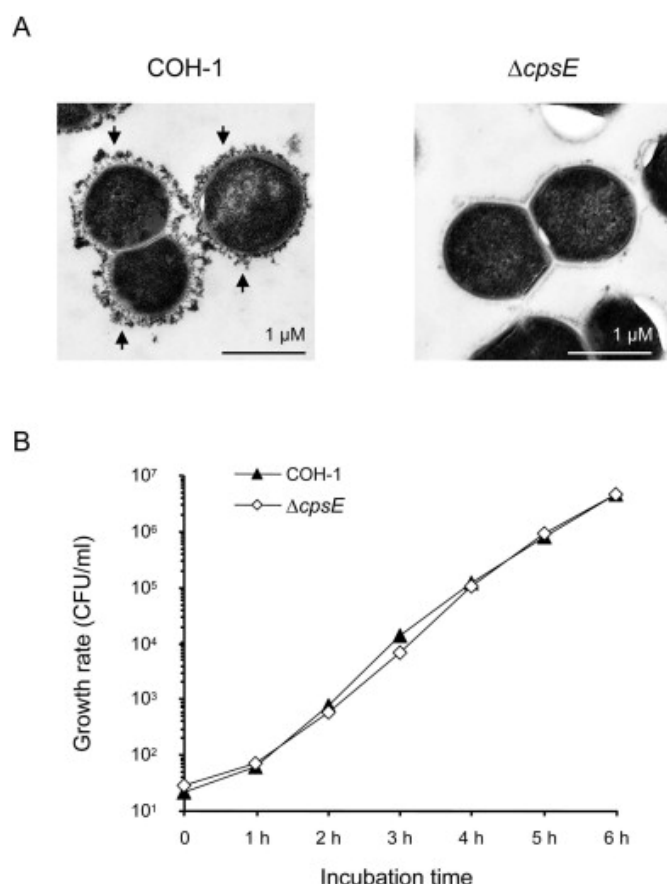
Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Supplemental Table 1. Strain COH-1 is a highly encapsulated type III GBS isolate extensively described in previous work (12-14). This strain was kindly provided by Dr. C.E. Rubens, University of Washington, Seattle, WA. An isogenic non-encapsulated ($\Delta cpsE$) mutant was constructed (see below). GBS strains were grown in Todd-Hewitt Broth (THB) or agar (THA) (Becton Dickinson, Mississauga, Ontario, Canada) or on sheep blood agar plates at 37 °C for 18 h. *Escherichia coli* strains were cultured in Luria-Bertani broth or agar (Becton Dickinson) at 37 °C for 18 h. When necessary, antibiotics (Sigma–Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) were added to culture media at the following concentrations: kanamycin and spectinomycin at 50 µg/ml for *E. coli*, and spectinomycin at 200 µg/ml for GBS. To perform GBS-bmDCs interaction studies, isolated GBS colonies were inoculated in THB, incubated for 16 h at 37 °C with shaking. Working cultures were obtained by inoculating 100 µl of the 16 h-culture into 10 ml of THB followed by incubation for 5 h at 37 °C with shaking. Bacteria were washed twice in PBS, pH 7.3 and appropriately diluted in complete cell culture antibiotic-free medium. The number of CFU/ml in the final suspension was determined by plating samples onto THA using an Autoplate 4000 Automated Spiral Plater (Spiral Biotech, Norwood, MA).

Construction of GBS non-encapsulated mutant

GBS genomic DNA was prepared by the guanidium thiocyanate method. Minipreparations of recombinant plasmids and transformation of *E. coli* were performed by standard procedures. Restriction enzymes and DNA-modifying enzymes were purchased from TaKaRa Bio (Otsu, Shiga, Japan) and used according to the manufacturers' recommendation. PCR reactions were carried out with iProof proofreading DNA polymerase (BioRad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada). Oligonucleotide primers were purchased from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). Amplification products were purified on Sephadex S-400 columns (GE Healthcare, Piscataway, NJ) and sequenced with an ABI 3730xl automated DNA sequencer, using the Bigdye terminator sequencing kit version 3.1 (Applied Biosystems, Streetsville, Ontario, Canada). The DNA sequence of GBS strain COH-1 capsular (*cps*) locus was retrieved from GenBank (Accession number

AF16383). Precise, in-frame deletion of the *cpsE* (1032 bp) gene was constructed by using splicing-by-overlap-extension PCR and the primers listed in Supplemental Table 1. The PCR-generated $\Delta cpsE$ deletion allele was cloned into plasmid pCR2.1 (Invitrogen), extracted with BamHI and PstI and recloned into the thermosensitive shuttle plasmid pSET-4s (15) digested with the same enzymes, giving rise to the knockout vector p4 $\Delta cpsE$. Electroporation of GBS with the recombinant plasmid and procedures for isolation of



mutants were those described previously (16). Allelic replacement was confirmed by PCR and sequencing analysis. The non-encapsulated ($\Delta cpsE$) phenotype of the mutant was confirmed by absence of reaction in the coagglutination test using rabbit antisera against GBS type III capsular material (Denka Seiken, Campbell, CA), and by transmission electron microscopy (TEM) using polycationic ferritin labeling as previously described (16)(Supplemental Fig. 1). Growth rates were not significantly affected in the mutant strain compared to wild-type (WT) GBS (Supplemental Fig. 1).

Supplemental Fig. 1. Phenotypic characterization of the GBS mutant strain.

(A) Transmission electron micrographs of GBS strains labeled with polycationic ferritin show GBS wild-type strain COH-1 with a thick capsule (indicated by arrows) whereas no capsular material is observed in $\Delta cpsE$ mutant strain. For ferritin labeling, bacterial cells were fixed in cacodylate-glutaraldehyde buffer prior to polycationic ferritin staining for 30 min at 20 °C. Bacterial cells were then immobilized in 4% agar, postfixed with 2% osmium tetroxide, and samples were dehydrated in a graded series of ethanol. All the solutions used in processing the specimens contained 0.05% ruthenium red. Thin sections of resin embedded samples were poststained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Philips CM 100 electron microscope. **(B)** Growth curves of GBS wild-type strain COH-1 and $\Delta cpsE$ mutant strain.

Generation of bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs) and purification of primary spleen DCs

BmDCs were generated from female C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). All experiments involving mice were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the Animal Welfare Committee of Université de Montréal. BmDCs were produced according to a technique described elsewhere (17). Briefly, after red blood cell lysis, total bone marrow cells (2.5×10^5 cells/ml) were cultured in complete medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 20 µg/ml gentamycin, 100 U/ml penicillin-streptomycin, 2 mM l-glutamine and 50 µM 2-ME. All reagents were from Gibco (Invitrogen). Complete medium was complemented with 20% GM-CSF from a mouse GM-CSF transfected cell line (Ag8653) as a source of GM-CSF (17). Cells were cultured for 7 days at 37 °C with 5% CO₂. On day 7, clusters were harvested and subcultured overnight to remove adherent cells. Non-adherent cells were collected on day 8 and used as immature bmDCs for the studies. Cell purity was routinely $\geq 88\%$ CD11c^{high} and F4/80^{-dim} cells as determined by FACS analysis (Supplemental Fig. 2), values that were in agreement with those reported in other studies (18-20). Staining for CD3 and granulocyte differentiation antigen 1 (Gr-1; also known as Ly-6 G) were also included as purity controls (Supplemental Fig. 2). For confirmation, bmDCs were further purified by positive selection using anti-CD11c microbeads by MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). The resulting bmDCs were routinely $> 90\text{--}95\%$ CD11c⁺, in agreement with previously published data (21). For comparative purposes, in selected experiments primary spleen DCs purified by MACS as previously described (22), were included.

Cell toxicity test

Cell toxicity induced by different GBS strains and concentrations was evaluated by measuring the release of lactate dehydrogenase enzyme (LDH) with the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI) as previously described (16). LDH results showed that GBS strains induced significant cytotoxicity ($>10\text{--}15\%$) after 6 h of incubation when used at concentrations higher than 10^6 CFU/ml (Supplemental Fig. 2). No

differences in toxicity levels were observed between the mutant strain and the WT strain (data not shown).

Bacterial internalization assay

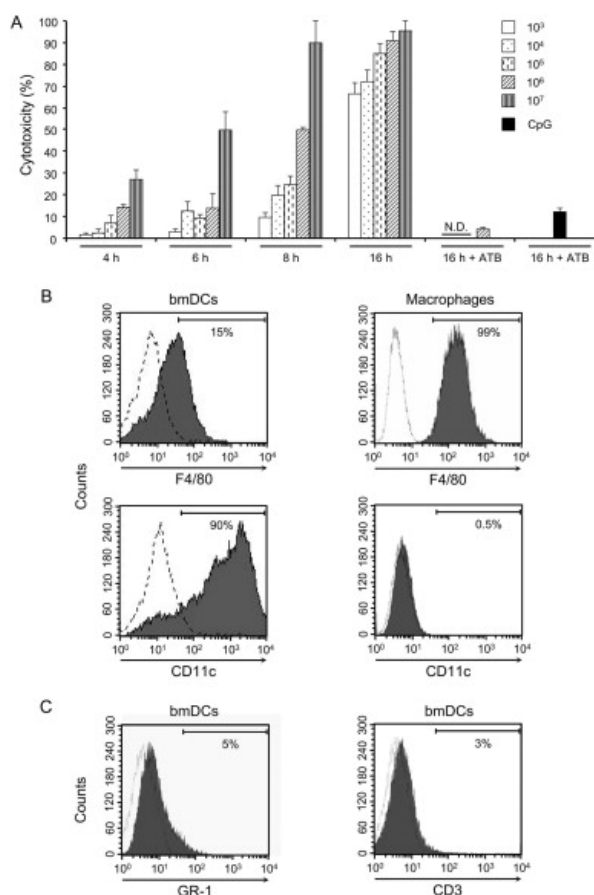
BmDCs or spleen DCs at a concentration of 10^6 cells/ml were infected with 10^6 CFU/ml of different GBS strains (initial MOI:1), and incubated for 0.5–6 h at 37 °C with 5% CO₂. After incubation, 100 µg/ml of gentamycin and 5 µg/ml of penicillin G (Sigma–Aldrich) were added to kill extracellular bacteria. It has been demonstrated that these antibiotics do not penetrate eukaryotic cells under these conditions (23), and preliminary studies have shown that these concentrations of antibiotics were able to kill any remaining extracellular bacteria (data not shown). After 1 h-antibiotic treatment, cells were washed 3 times with PBS, lysed with sterile water and viable intracellular streptococci enumerated by quantitative plating of serial dilutions of the lysates on THA. In selected experiments, cytochalasin D at 0.1, 0.5, 1.0, and 2.0 µg/ml was added to bmDCs for 30 min prior to bacterial infection (initial MOI:1) for 60 min and phagocytosis was evaluated as described above.

For intracellular survival studies, internalization assays were performed as described above, except that after a 60 min initial bacterial-cell contact, gentamycin-penicillin were added and the treatment was lengthened for different times up to 5 h. The results were expressed as CFU/ml of recovered intracellular viable bacteria.

In vitro DC stimulation assay

BmDCs or spleen DCs were resuspended at 10^6 cells/ml in complete medium and stimulated with 1 µM CpG (ODN 1826, Coley Pharmaceutical Inc., Düsseldorf, Germany), used as positive control, or different GBS strains (10^6 CFU/ml; initial MOI:1). After 2 h of DC-GBS infection, the bacteriostatic agent chloramphenicol (CM, 12 µg/ml, Sigma–Aldrich) was added to the culture to prevent cell toxicity. CM is a bacteriostatic agent, keeping a low and controlled level of bacteria through the incubation period ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml). Time of bacteria-cell contact prior to CM treatment and minimal CM dose required were selected based on preliminary studies on cytokine production combined with LDH test (Supplemental Fig. 2, and data not shown). The chosen dose of CM had no effect of cytokine profiles

induced by either the positive or the negative control (data not shown). To evaluate the role of bacterial phagocytosis in bmDC activation, cytochalasin D at 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was added to bmDCs for 30 min prior to bacterial infection. At different time intervals, supernatants were collected for cytokine quantification by ELISA and cells were harvested for analysis of co-stimulatory molecule expression by FACS. Non-stimulated cells served as negative control. In selected experiments, 10^8 latex beads (2 μm , Molecular Probes, Invitrogen) were used as an additional control. All solutions and bacterial preparations used in these experiments were tested for the absence of endotoxin using a Limulus amoebocyte lysate test (Pyrotell, STV, Cape Cod, MA) with a sensitivity limit of 0.03 EU/ml.



Supplemental Fig. 2. Cell culture quality controls.

(A) GBS dose and time dependent cytotoxicity to dendritic cells (DCs). Bone marrow-derived DCs (bmDCs) were infected by wild-type GBS strain COH-1 at different concentrations (CFU/ml) for 4, 6, 8, and 16 h. Cytotoxicity (%) was evaluated by measuring the release of lactate dehydrogenase enzyme (LDH) with the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. In selected experiments, bmDCs were stimulated with CpG (1 μM), or wild-type GBS strain COH-1 (10^6 CFU/ml, initial MOI:1). After 2 h of bmDC-GBS infection, a bacteriostatic agent (chloramphenicol, 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to the culture. Cytotoxicity (%) was evaluated as described above after 16 h of incubation (referred here as 16 h + ATB). **(B)** FACS analysis of expression levels of CD11c and F4/80 markers on bmDCs compared to C57BL/6 mouse bone marrow-derived macrophages (produced as reported, reference (46)). **(C)** FACS analysis of bmDC purity using PE-labeled anti-mouse CD3 mAb (clone 145-2C11) and anti-mouse Ly-6 G and Ly-6C mAb (clone RB6-8C5). The RB6-8C5 mAb reacts with a common epitope on Ly-6 G and Ly-6C, previously known as the myeloid differentiation antigen Gr-1, which is expressed by granulocytes.

Cytokine quantification by ELISA

Levels of IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α , CXCL1 (KC), CXCL9 (MIG) and CXCL10 (IP-10) in cell culture supernatants were measured by sandwich ELISA using pair-matched antibodies from R&D Systems (Minneapolis, MN) or eBioscience (San Diego, CA), according to the manufacturer's recommendations. Twofold dilutions of recombinant mouse cytokines were used to generate standard curves. Sample dilutions giving OD readings in the linear portion of the appropriate standard curve were used to quantify the levels of each cytokine.

FACS analysis

For cell surface staining, 10^6 cells were washed and treated for 30 min on ice with FcR-blocking reagent (Fc γ III/II R α Ab, BD PharMingen, BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada) in sorting buffer (PBS-1% fetal bovine serum). Blocked cells were then incubated with FITC-labeled anti-mouse CD11c mAb (BD PharMingen) for 1 h on ice followed by washing and staining for 1 h with PE-labeled mAbs against the following surface molecules: CD80 (clone 16-10A1), CD86 (clone GL1), CD40 (clone 3/23), CD54 (clone 3E2) and MHC class II (A β ^b; clone AF6-120.1), all from BD PharMingen. For cell culture purity tests, PE-labeled anti-mouse CD11c mAb (clone HL3), FITC-labeled anti-mouse F4/80 mAb (clone C1:A3-1), FITC-labeled anti-mouse Gr-1 mAb (clone RB6-8C5), and PE-labeled anti-mouse CD3 mAb (clone 145-2C11) were used (Supplemental Fig. 2). After washing, cells were resuspended in sorting buffer for FACS analysis. Flow cytometry was performed using a FACSCalibur instrument (BD Biosciences). Twenty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using CellQuest software. Quadrants were drawn based on FITC- and PE-control stains and were plotted on logarithmic scales.

Confocal microscopy

For immunofluorescence studies, bmDCs, treated or not with cytochalasin D as described above, were placed on coverslips and infected with 10^6 CFU/ml of different GBS strains (initial MOI:1). Unless specified, after 2 h of bacteria-cell contact, coverslips were washed with PBS three times to remove non-associated bacteria. Cells were fixed with methanol/acetone (80:20) for 20 min at -20°C , washed and blocked for 10 min. Coverslips

were incubated for 1 h with rabbit anti-GBS serum and with rat anti-mouse lysosomal-associated membrane protein-1 (LAMP-1) mAb (Clone 1D4B, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA). After washing, coverslips were incubated with different combination of secondary antibodies Alexa-Fluor 488 (green) or Alexa-Fluor 568 (red) goat anti-rabbit IgG or goat anti-rat IgG (Invitrogen) for 30 min, washed and mounted on glass slides with moviol containing DABCO and DAPI to stain the nuclei. Samples were observed with an Olympus FluoView™ FV1000 confocal laser scanning microscope and analyzed using Fluoview software (Markham, ON, Canada).

Electron microscopy analysis

For TEM and scanning electron microscopy (SEM), GBS strains were incubated with bmDCs for 4 h. After two washes with PBS, samples were fixed for 1 h at room temperature with 2% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3) and postfixed for 45 min at room temperature with 2% osmium tetroxide in deionized water. Specimens for TEM were dehydrated in a graded series of ethanol and embedded with LR White resin. Thin sections were poststained with uranyl acetate and lead citrate. Samples were observed with an electron microscope model JEOL JEM-1230 (Tokyo, Japan). Samples for SEM were dehydrated in a graded series of ethanol solutions and covered with gold after critical point drying and were examined with a Hitachi S-3000 N microscope.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed for significance using Student's unpaired *t*-test. A *P* value < 0.05 was used as a threshold for significance. All experiments were repeated at least three times. Confocal microscopy data analysis was performed using the Fluoview software. Integrated fluorescence intensities for each fluorescence channel were analyzed. Briefly, 60 cells were randomly selected for each condition. Average integrated fluorescence was calculated by the software and the obtained ratio was normalized according to DAPI/Nuclei channel variance between samples.

Results

DCs efficiently internalize both the non-encapsulated and the encapsulated GBS strains, but the latter shows stronger capacity to survive intracellularly

As antigen uptake is the first step in APC activation we performed an antibiotic-protection phagocytosis assay to evaluate GBS internalization by DCs. Compared to the classical bactericidal test, in this assay extracellular bacteria are eliminated by an antibiotic-treatment step and only intracellular bacteria are thus precisely quantified. As shown in Fig. 1A, under non-opsonic conditions, the encapsulated WT strain was rapidly internalized by bmDCs. Phagocytosis levels increased over time reaching levels as high as 10^7 CFU/ml of total recovered intracellular bacteria. At short incubation times the $\Delta cpsE$ mutant was significantly more internalized than the WT strain, though differences were lost after longer incubation times. Extracellular bacterial replication over the incubation time was similar between the two strains (Supplemental Fig. 1). Thus differences in the levels of bacterial internalization between strains likely reflect the capacity of bmDCs to more easily and faster internalize the mutant strain at early time points.

As antigen capture capacity might differ depending on the DC subset, we next evaluated GBS internalization by spleen DCs, which contains the two major DC subsets, CD8⁻ and CD8⁺. Phagocytosis levels were similar to those observed with bmDC ($P > 0.05$), albeit the differences between the WT and the $\Delta cpsE$ mutant in terms of internalization were more marked (Fig. 1B).

To analyze the fate of bacteria once internalized, we modified the phagocytosis assay in order to quantify bacterial intracellular survival over time. After optimal internalization following 60 min incubation of GBS with bmDCs, antibiotics were added and incubation extended for different periods of time up to 5 h. A slow decrease in WT GBS intracellular survival was observed (Fig. 1C), which was significant only after 3 h of GBS post-internalization, with $\sim 2 \times 10^3$ CFU of remaining live intracellular bacteria at the end of the survival test. At early time points, the decrease in intracellular survival of the $\Delta cpsE$ mutant was faster than that observed for WT GBS, and significant differences were observed as soon as 1 h of mutant strain post-internalization (Fig. 1C). Compared to initial numbers of phagocytosed bacteria (time 0), there was a 25-fold reduction in intracellular

numbers of the $\Delta cpsE$ mutant bacteria, while only an 8-fold decrease in WT GBS intracellular numbers was observed at the end of the survival test.

We next evaluated if GBS intracellular fate might vary upon DC origin (Fig. 1D). Using spleen DCs we observed a reduction in intracellular numbers of WT GBS compared to that observed with bmDCs (8-fold decrease vs. 15-fold decrease, $P < 0.05$). The

difference between bmDCs and spleen DCs in their capacity to destroy intracellular bacteria was even more marked in the case of the $\Delta cpsE$ mutant, which showed 56-fold reduction in intracellular numbers (Fig. 1D).

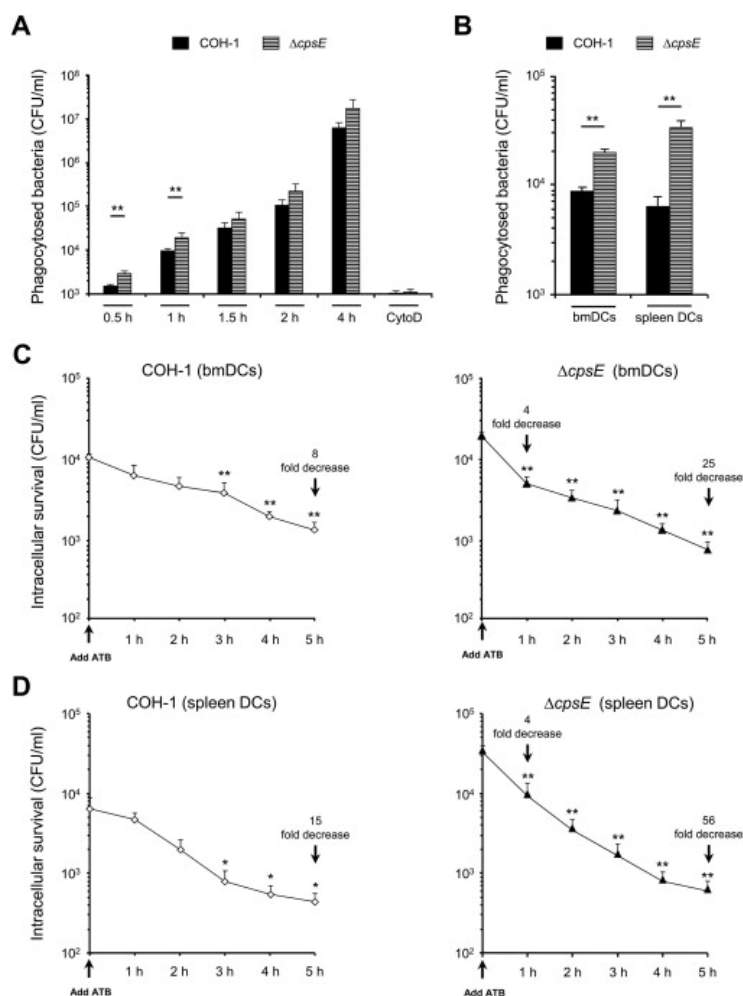


Fig. 1. GBS phagocytosis by and intracellular survival within DCs: role of bacterial capsular polysaccharide.

(A) Wild-type GBS strain COH-1 or the $\Delta cpsE$ mutant (10^6 CFU/ml, initial MOI:1) were incubated with bmDCs for different time periods. Internalized bacteria were enumerated by quantitative plating after 1 h of antibiotic treatment to kill extracellular bacteria. At a selected time point of 60 min, bmDC were pre-treated with 2 μ g/ml cytochalasin D (CytD) and phagocytosis evaluated

as described. ** $P < 0.01$, indicates statistically significant differences between the wild-type strain and the $\Delta cpsE$ mutant, $n = 5$. (B) MACS purified-spleen DCs were infected with GBS strains for 60 min (10^6 CFU/ml, initial MOI:1). Internalized bacteria were enumerated as indicated above. ** $P < 0.01$, indicates statistically significant differences between the wild-type strain and the $\Delta cpsE$ mutant, $n = 4$. (C and D) For intracellular survival assays, bmDCs or spleen DCs were infected with GBS strains (MOI:1) and phagocytosis was left to proceed for 60 min. Antibiotics (ATB) were then added for 1 h (defined as time 0). This initial antibiotic-treatment was extended up to 5 h and cells lysed to quantify intracellular bacteria by viable plate counting. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$, indicates incubation times for which significant differences in the numbers of recovered intracellular bacteria were observed compared to time 0, $n = 8$ (bmDCs) and $n = 4$ (spleen DCs). All results are expressed as CFU recovered bacteria per ml (means \pm SEM).

Intracellular GBS locates within LAMP-1+ phagosomes in bmDCs

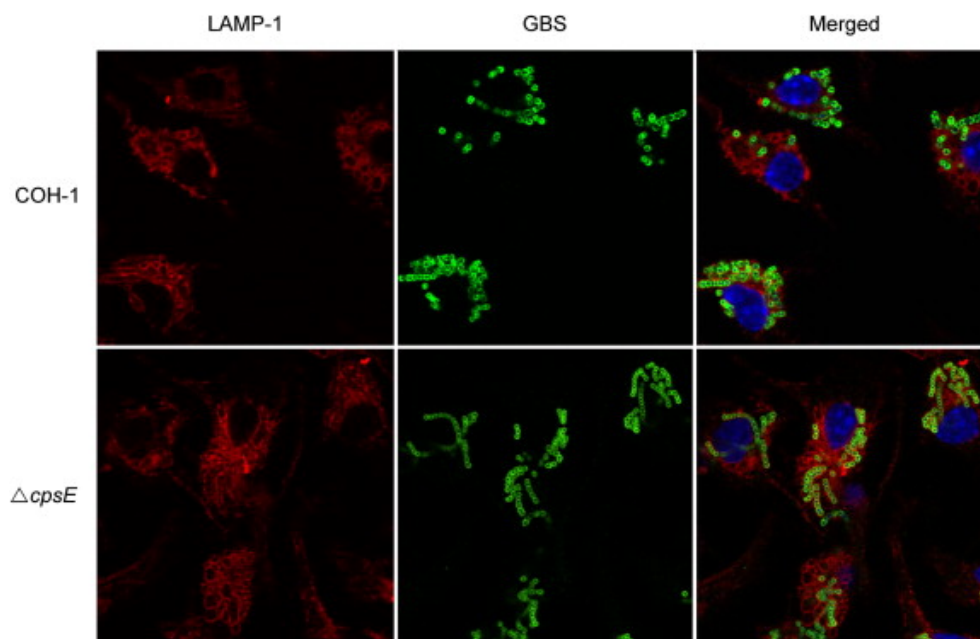
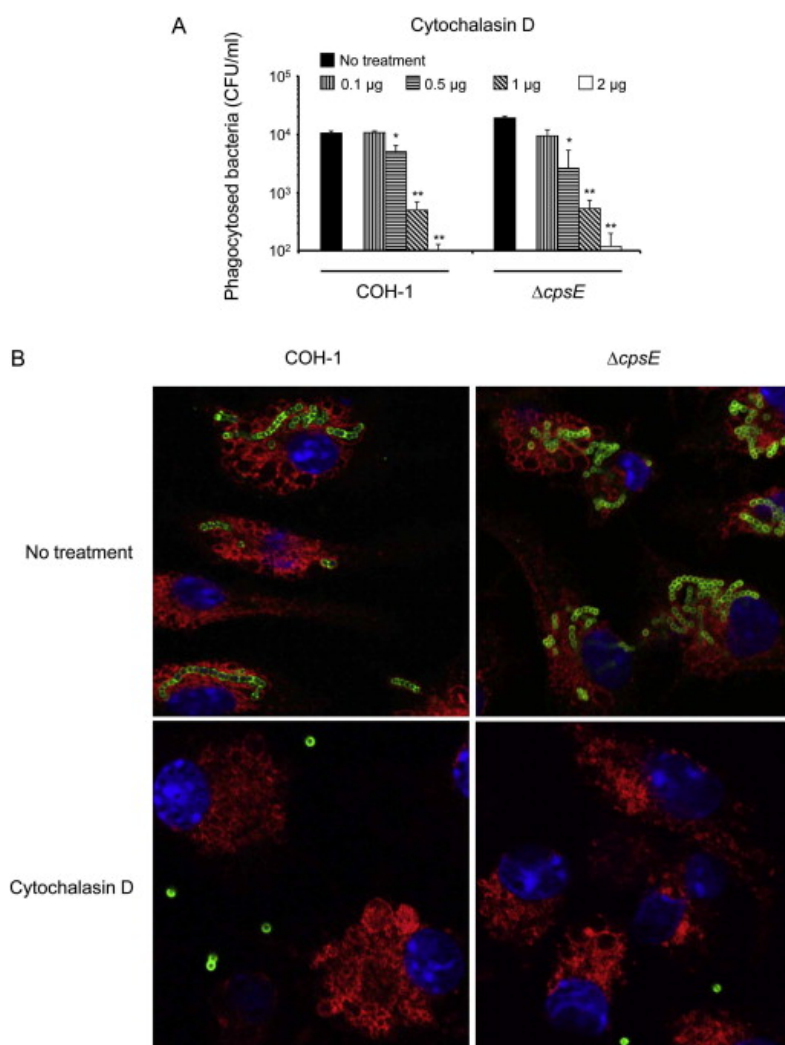


Fig. 2. Confocal laser scanning microscopy of GBS internalization by DCs.

BmDCs were incubated with the wild-type strain COH-1 or the $\Delta cpsE$ mutant (10^6 CFU/ml, initial MOI:1). After bacterial-cell contact for 2 h, cells were fixed and labeled with serum against GBS (Alexa-Fluor 488, green) and a mAb specific for LAMP-1 (Alexa-Fluor 568, red). DAPI was used to stain the nuclei (blue). Left and middle panels, red and green optical sections; right, merged sections. Merge of optical sections shows intracellular localization of GBS strains inside LAMP-1+ vacuoles.

Internalized bacteria are contained within phagosomes that might mature into phagolysosomes. During maturation, phagosomes sequentially fuse with and acquire membrane markers of early endosomes and late endosomes, including LAMP-1 (24). Thus, to confirm the intracellular location of the bacteria, confocal microscopy was performed using serum against GBS and an antibody specific for LAMP-1. Confocal microscopy analysis under non-opsonic conditions showed that the number of intracellular GBS within LAMP-1+ vacuoles varied from few cocci per cell to more than 30 within the same bmDC. A tendency of the mutant strain to be more internalized than WT GBS was noticeable (Fig. 2). Quantification of average integrated fluorescence intensities (FI) showed a FI value of 183144 ± 23236 for WT GBS-infected bmDCs compared to a FI value of 223049 ± 14344 for $\Delta cpsE$ mutant strain-infected cells.

We also performed the phagocytosis assay in presence of cytochalasin D, an inhibitor known to disrupt actin filament polymerization. GBS internalization was dramatically decreased after bmDC pre-treatment with cytochalasin D in a dose-dependent fashion. Quantitative phagocytosis and confocal microscopy (Supplemental Fig. 3) demonstrated that almost complete inhibition is achieved at 2 $\mu\text{g/ml}$ of cytochalasin D (also see Fig. 1A). Both WT and $\Delta cpsE$ strains were affected similarly by this reagent, confirming phagocytosis of both GBS strains.



Supplemental Fig. 3. Blockade of actin filaments confirms GBS internalization by DCs.

(A) BmDCs were pre-treated with cytochalasin D, a disruptor of actin filaments, at different doses 30 min prior to bmDC infection with wild-type GBS strain COH-1 or the $\Delta cpsE$ mutant (10^6 CFU/ml, initial MOI:1) for 60 min. Numbers of internalized bacteria were determined by quantitative plating after 1 h of antibiotic treatment to kill extracellular bacteria and expressed as CFU recovered bacteria per ml (means \pm SEM) obtained from four independent experiments. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$, indicates statistically significant differences between non-treated cells and treated cells. (B) Confocal laser scanning microscopy studies of GBS internalization by non-treated or cytochalasin D (2 μ g)-treated bmDCs. After a bacterial-cell contact of 2 h (initial MOI:1), cells were fixed and labeled with serum against GBS (Alexa-Fluor 488, green) and a mAb specific for LAMP-1 (Alexa-Fluor 568, red). DAPI was used to stain the nuclei (blue). Images are representative of three independent experiments.

Electron microscopy shows GBS localization inside bmDC phagosomes

As electron microscopy is the ultimate technique to verify the intracellular location of organisms, SEM and TEM examination were performed to confirm confocal microscopy results. SEM showed that after 4 h-infection of bmDCs with either the WT strain or the non-encapsulated $\Delta cpsE$ mutant, numerous cocci were found associated to the cell surface, underneath as well inside the cells (Fig. 3A). TEM analysis confirmed the intracellular location of bacteria and showed that bmDCs contained high numbers of intracellular WT strain and non-encapsulated $\Delta cpsE$ mutant (Fig. 3B). The uptake process was accompanied by the formation of phagosomes in which streptococci seemed to reside. These phagosomes appeared to contain one or more bacteria.

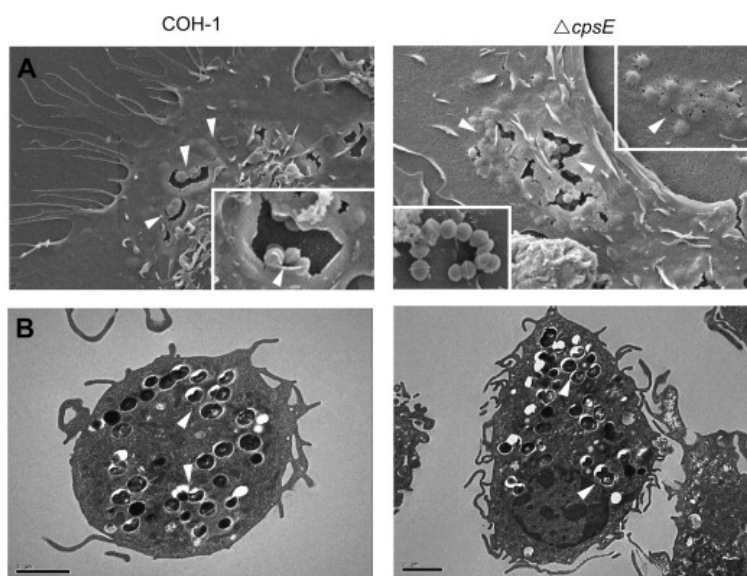


Fig. 3. Electron microscopy studies of GBS interactions with DCs.

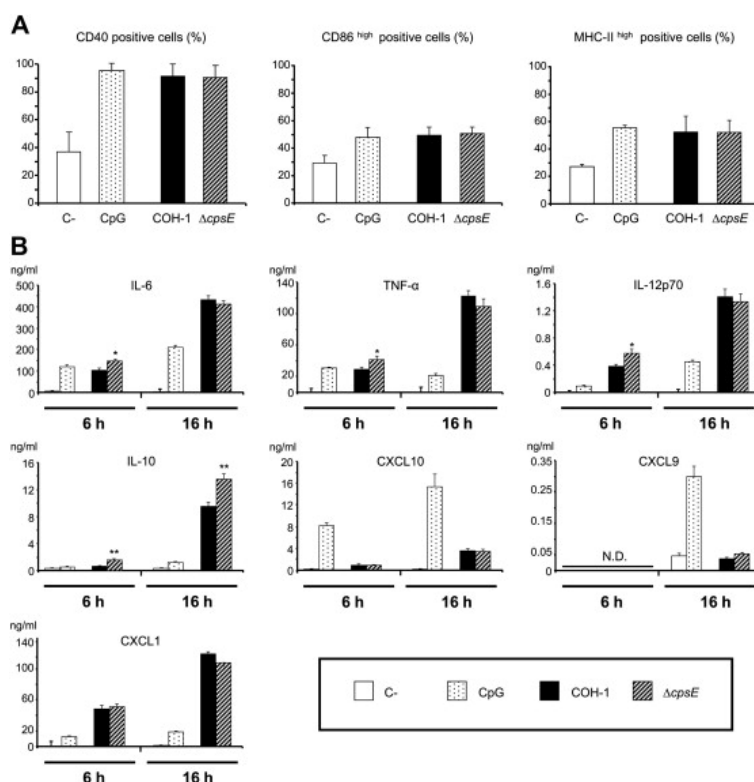
BmDCs were incubated with wild-type GBS strain COH-1 or the $\Delta cpsE$ mutant (10^6 CFU/ml, initial MOI:1) for 4 h. **(A)** Scanning electron micrographs show large quantity of cocci (white arrows) associated to or underneath the cell surface (inserts). BmDCs incubated with the non-encapsulated strain $\Delta cpsE$ show several chains of cocci adhering to the cells (insert). Original magnification 5000X. **(B)** Transmission electron micrographs confirm internalization of GBS by bmDCs as most cells contained high numbers of intracellular cocci (white arrows). Original magnification 10000X. Images are representative of two independent experiments.

GBS induces bmDC maturation and activation

A critical determinant of DC function is their level of maturation. Induction of DC maturation increases their potential to stimulate T cells. Phenotypically, immature DCs are characterized by low surface expression of MHC class I and II proteins, and co-stimulatory molecules (CD40, CD80, and CD86) (25), data in agreement to values observed in our bmDC cultures under steady conditions (Fig. 4A). In contrast, mature DCs normally possess high surface expression of these markers. Maturation is a terminal and critical event in DC development. DCs require maturation before exhibiting their full immunostimulatory potential (26, 27). To evaluate GBS capacity to induce bmDC maturation, we investigated expression levels of the co-stimulatory molecules CD40, CD54, CD80, CD86 and MHC-II on bmDCs. The phenotypes of bmDCs were evaluated by FACS at 16 h post-infection. No significant changes in CD54 and CD80 expression in response to GBS stimulation were observed compared to control cells (data not shown). However, GBS-stimulated bmDCs showed higher expression levels of CD40 in terms of the percentage of cells expressing this marker and in mean fluorescence intensity. Two well segregated sub-populations, a CD86^{high} and MHC-II^{high} subset and a CD86^{low} and MHC-II^{low} subset, were observed among the CD11c+ bmDC population, as already reported (16). GBS stimulation resulted in higher percentages of CD86^{high} and MHC-II^{high} sub-populations compared to control cells. No differences were observed between the WT strain and the mutant strain (Fig. 4A).

Production of cytokines by DCs plays a major role not only in modulating the innate immune response, but also in shaping the ensuing adaptive response to a pathogen. Thus, to evaluate GBS capacity to induce DC activation, the levels of selected cytokines and chemokines in the supernatants of GBS-infected bmDCs were quantified (Fig. 4B). The pro-

inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α have been shown to be major mediators of GBS sepsis (5, 7). As shown in Fig. 4B, GBS-activated bmDCs produced very high levels of these two pro-inflammatory cytokines. In addition, bmDCs also released significant amounts of the Th1-driving cytokine IL-12p70 and of the regulatory IL-10 after exposure to GBS strains. Maximal production of all these cytokines was observed at 16 h post-infection compared to



control, non-activated cells ($P < 0.001$). Kinetics of cytokine production were similar between encapsulated WT GBS and the $\Delta cpsE$ mutant strain. The mutant strain showed slightly higher stimulatory capacity at shorter incubation times (6 h post-infection) compared to the WT strain. However, with the exception of IL-10, the observed differences disappeared at longer incubation times (16 h).

Fig. 4. GBS induces DC surface expression of co-stimulatory molecules and cytokine release.

BmDCs were stimulated with CpG (1 μ M), wild-type GBS strain COH-1 or $\Delta cpsE$ mutant strain (10^6 CFU/ml, initial MOI:1). After 2 h of bmDC-GBS infection, a bacteriostatic agent (chloramphenicol, 12 μ g/ml) was added to the culture to prevent cell toxicity. Non-stimulated cells served as negative control (C-) for basal expression levels. **(A)** Cells were harvested at 16 h of incubation and co-stimulatory molecule expression analyzed by FACS. Histograms were obtained by gating cells based on positive CD11c staining. Data are expressed as mean \pm SEM (in %) from five independent experiments. **(B)** Supernatants were harvested at 6 h and 16 h of incubation and cytokine production quantified by ELISA. Data are expressed as mean \pm SEM (in ng/ml) from eight independent experiments. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$, indicates statistically significant differences between wild-type strain and the $\Delta cpsE$ mutant strain.

As anti-bacterial polymorphonuclear leukocyte activity has been shown to play an important role in the innate immune response to GBS (7), we also evaluated the production of CXCL1, a neutrophil chemoattractant factor. Similar high levels of CXCL1 were induced by both GBS strains (Fig. 4B), indicating that CPS does not interfere or modulate the production of this chemokine. Considering the central role of DCs as APC able to activate NK and T cells, the levels of the chemokines CXCL9 and CXCL10 were also evaluated in GBS-activated bmDCs. GBS strains induced low, but significant, levels of CXCL10 production by bmDCs and failed to induce significant levels of CXCL9 as compared to control, non-infected cells ($P > 0.05$). It should be noted that CpG, used as positive control, induced the release of high levels of these two CXC chemokines, indicating optimal cell culture conditions. Results from cytokine and FACS analysis were confirmed with bmDCs purified by MACS (data not shown).

The presence of CPS differentially regulates cytokine production by spleen DCs

Pattern of cytokine production might vary upon DC phenotype and origin (25, 27), thus we decided to evaluate the capacity of GBS to modulate cytokine production by freshly isolated spleen DCs (Fig. 5). Overall, cytokine production by GBS-infected spleen DCs was lower than that of infected bmDCs (pg/ml range vs. ng/ml range). Production of CXCL9 was the only exception, as significant levels of secretion of this chemokine was observed in GBS-infected spleen DCs (Fig. 5F), but not in bmDC counterparts (Fig. 4B).

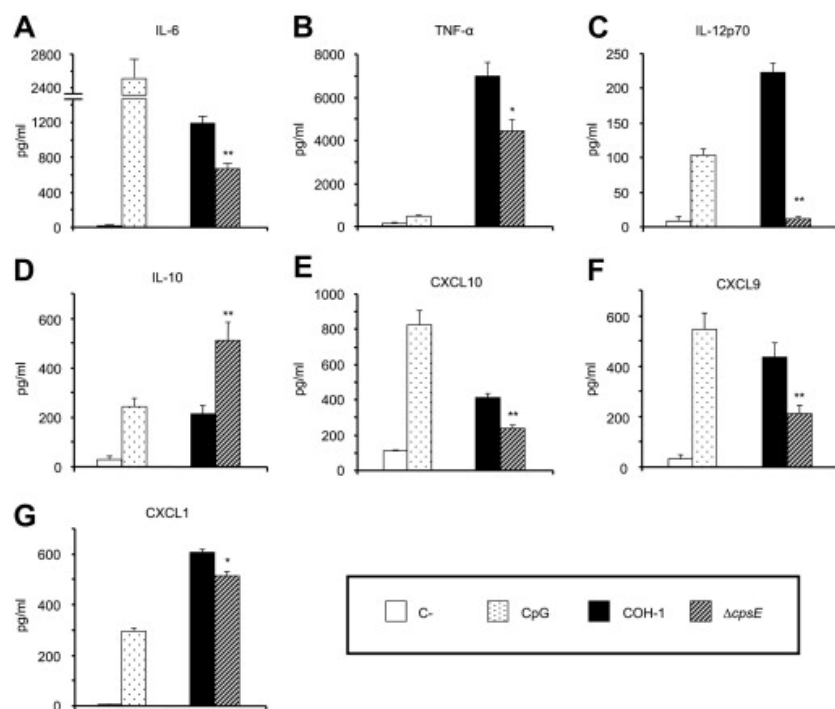


Fig. 5. Encapsulated GBS modulates cytokine production by primary spleen DCs.

Spleen DCs were stimulated with CpG (1 μ M), wild-type GBS strain COH-1 or $\Delta cpsE$ mutant strain (10^6 CFU/ml, initial MOI:1). After 2 h of bmDC-GBS infection, a bacteriostatic agent (chloramphenicol, 12 μ g/ml) was added to the culture to prevent cell toxicity. Non-stimulated cells served as negative control (C-) for basal expression levels. Supernatants were harvested at 16 h of incubation and cytokine production quantified by ELISA. Data are expressed as mean \pm SEM (in pg/ml) from five independent experiments. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$, indicates statistically significant differences between wild-type strain and the $\Delta cpsE$ mutant strain.

We next evaluated the role of CPS in modulating cytokine production by spleen DCs. Similarly to that observed with bmDCs, production of IL-10 was significantly higher in spleen DCs activated by the $\Delta cpsE$ mutant strain compared to those activated by WT GBS (Fig. 5D). However, at 16 h post-infection the production of all other cytokines was significantly reduced in $\Delta cpsE$ mutant-infected spleen DCs compared to WT GBS-infected counterparts (Fig. 5), suggesting differences in the kinetics of cytokine production between bmDCs and spleen DCs.

Effect of bacterial phagocytosis on bmDC activation levels

DC activation can be either surface receptor-mediated or intracellular receptor-mediated or both. As the initial levels of GBS internalization were similar between bmDCs and spleen DCs (Fig. 1), we used bmDCs as a model to evaluate the role of phagocytosis as signal for triggering cytokine release. To this aim, bmDC were pre-treated with cytochalasin D prior to GBS stimulation, based on our previous finding that this inhibitor almost completely abrogated bacterial internalization (Supplemental Fig. 3). As a control, we used 2 μ m-latex beads. Latex beads failed to induce significant release of cytokines compared to non-stimulated control cells throughout a period of 16 h (data not shown). As shown in Fig. 6, IL-12p70, IL-10 and CXCL10 were the only three cytokines whose production was almost completely abrogated by cytochalasin D treatment of GBS-infected cells (>90% of inhibition, Fig. 6A–C). For all other cytokines, cytochalasin D-mediated inhibition of GBS-induced cytokine production ranged from 53% to 76% (Fig. 6D–F). These data suggest that both strains use phagocytosis-dependent and -independent pathways for cytokine production.

We also evaluated the effect of bacterial phagocytosis in modulation of bmDC maturation. In contrast with our observations for cytokine production, phagocytosis was not significantly required for GBS-induction of co-stimulatory molecule expression for either strain. Cytochalasin D-mediated inhibition of GBS-induced expression of CD40 was $21 \pm 9\%$; of CD86, $11 \pm 6\%$ and of MHC-II, $29 \pm 10\%$ ($P > 0.05$). Similarly, surface

expression of co-stimulatory molecules was not affected by cytochalasin D in *Streptococcus pyogenes*-infected macrophages (9). These results suggest multiple mechanisms involved in GBS modulation of DC activation.

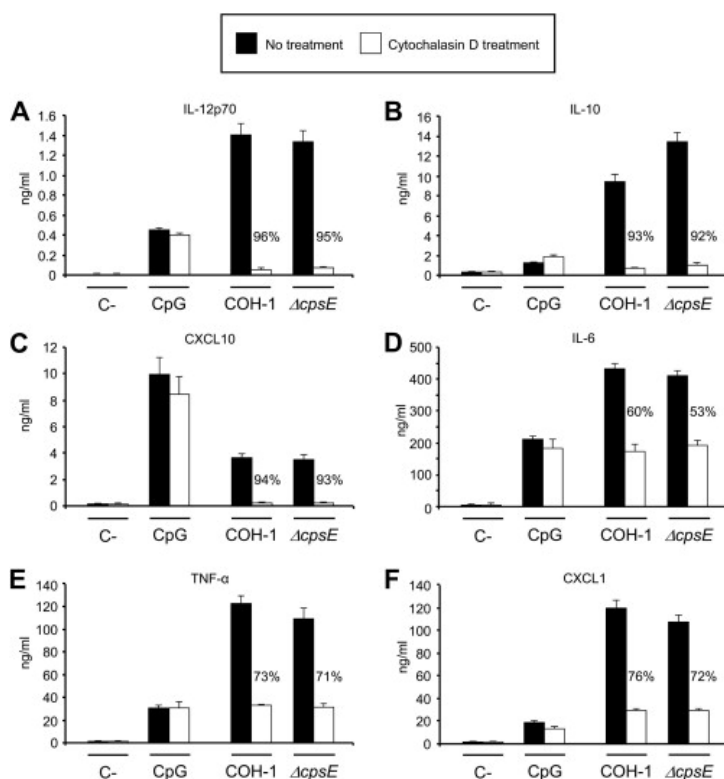


Fig. 6. Effect of bacterial phagocytosis on cytokine production by GBS-stimulated DCs.

BmDCs were either non-treated or pre-treated with cytochalasin D (2 $\mu\text{g/ml}$) for 30 min prior to stimulation with CpG (1 μM), wild-type GBS strain COH-1 or $\Delta cpsE$ mutant strain (10^6 CFU/ml, initial MOI:1). After 2 h of bmDC-GBS infection, a bacteriostatic agent (chloramphenicol, 12 $\mu\text{g/ml}$) was added to the culture to prevent cell toxicity. Supernatants were then harvested at 16 h of incubation and cytokine production quantified by ELISA. Non-stimulated cells served as negative control (C-). Data are expressed as mean \pm SEM (in ng/ml) from four independent experiments. The percentages of cytochalasin D-mediated inhibition of cytokine production are indicated.

Discussion

Despite the importance of DCs in shaping the immune response against pathogens, the interactions between GBS and DCs have not thoroughly been characterized, and only two additional studies are available on GBS activation of bmDC (13, 28). In fact, albeit extensive research on GBS interaction with professional phagocytes, such as macrophages and neutrophils, the strategies used by GBS to manipulate the functions of DCs, known as the most potent APCs, have not been investigated. This study addresses for the first time the role of GBS CPS in bacterial internalization by bmDCs and primary spleen DCs and the underlying consequences on their maturation and activation.

It has been well established that GBS is able to invade a variety of host-cell types, including epithelial cells, endothelial cells and macrophages (5, 7, 8, 14, 23). We used phagocytosis assays in combination with confocal and electron microscopy to measure the ability of DCs to internalize GBS. We observed that both bmDCs and spleen DCs efficiently internalize encapsulated GBS. Our results are in agreement with previous studies using macrophage/monocyte cell lines or primary macrophages or neutrophils of either human or mouse origin (14, 23, 29-31). Overall, the capacity of DCs to internalize encapsulated GBS seems similar or lower to that reported for these cells. It is generally accepted that different types of leukocytes differentially perform their specialized tasks. As such, it has been shown that neutrophils and monocytes exhibit a much higher capacity to kill ingested bacteria than DCs (9, 32). When we evaluated the capacity of bmDCs to eliminate encapsulated GBS, we observed that intracellular survival lasted at least 6 h. In a recent study, Mancuso *et al.* showed that encapsulated GBS survived longer in bmDCs compared to mouse macrophages (13). However, when we compared GBS survival rates within primary spleen DCs, a reduction in intracellular survival was observed, suggesting that spleen DCs possess stronger bactericidal capacity than bmDCs. In parallel studies we observed that *Streptococcus suis*, another well-encapsulated invasive meningeal pathogen, was readily and rapidly eliminated by bmDCs (16, 33). We thus speculated that the enhanced ability of encapsulated GBS to survive within bmDCs, and at least for few hours in spleen DCs, is not merely a reflection of the inherent capacity of these APCs to kill pathogens, but rather represents intrinsic GBS properties that allow this organism to resist or delay intracellular bactericidal DC mechanisms. Mancuso *et al.* studied the spatial relationships among GBS and bmDC endosomal markers with structured illumination fluorescence microscopy. They

found GBS antigens in two distinct bmDC intracellular compartments: bacterial DNA+ phagosomes and DNA- phagolysosomes containing partially digested GBS material (13). The potential capacity of GBS to avoid or delay phagosome maturation and/or fusion with lysosomes warrants future investigation.

As the role of CPS, a major GBS virulence factor, in the interactions of this pathogen with DCs has never been addressed, we constructed a non-encapsulated isogenic mutant. GBS devoid of CPS was internalized at higher and faster rates than encapsulated GBS early after infection, although the differences were less marked after longer incubation times. The survival of the non-encapsulated mutant was significantly impaired in both bmDCs and spleen DCs compared to WT GBS. As aforementioned, spleen DCs were particularly more efficient in destroying non-encapsulated GBS than bmDCs. The enhanced bactericidal capacity of spleen DCs might suggest that both CD8+ and CD8- DC sub-populations contributes to bacteria clearance. These data suggest that CPS facilitates, at least in part, GBS survival within DCs. In previous studies, it was shown that under non-opsonic conditions, non-encapsulated mutants were equally phagocytosed and survived at similar levels within macrophages than WT GBS (14, 30). Thus, the contribution of the CPS to the modulation of professional phagocyte functions vs. DC functions might be different. In this regard, it is important to notice that GBS CPS harbors terminal sialic acid residues. Sialic acid features prominently at terminal positions of many eukaryotic surface-exposed glycoconjugates and confers important properties at the cell surface. It is therefore not surprising that many pathogenic bacteria have evolved to express sialic acid to resist or modulate host immune responses and to interact specifically with different host cells (34). For example, it was reported that GBS sialic acid binds to Sia-binding immunoglobulin superfamily lectins (Siglecs) and impairs bactericidal functions of neutrophils (6). It has been suggested that expression of the sialylated CPS by *Neisseria meningitides* protects bacteria against phagosomal killing by human DCs and monocytes (35, 36).

One of the consequences of bacterial interaction with DCs is the induction of their maturation and activation. Encapsulated WT GBS was shown to induce increased expression of the co-stimulatory molecules CD40, CD86, as well as MHC-II; and to trigger DC release of several cytokines and chemokines. The production of these immune mediators was in general higher in GBS-infected bmDCs than in spleen DC counterparts. Similarly, it has been reported that primary spleen DCs infected *in vitro* with *Listeria*

monocytogenes secrete lower levels of cytokines than bmDCs (27). In agreement with these observations, DCs generated by endogenous GM-CSF overexpression *in vivo* show a high level cytokine-profile compare to control DCs, suggesting an important immuno-modulatory role of GM-CSF during DC development (25).

We next evaluated the role of CPS in GBS modulation of DC functions. In the absence of the CPS shield, exposition of highly immunogenic cell wall components might induce increased DC activation, as already observed for other encapsulated pathogens (16, 33, 36). A transient increase in the release of several cytokines was observed in bmDCs infected with the non-encapsulated mutant; however, these differences were lost at longer incubation times. The only exception was IL-10, which production was consistently higher in bmDCs infected with the mutant strain. In the absence of CPS, the production of IL-10 in infected spleen DCs was even more marked; reaching almost a 3 fold increase compared to WT GBS-infected counterparts. Another striking feature is that the production of all other cytokines by spleen DCs was indeed reduced or almost completely inhibited (as for IL-12p70) after infection with the non-encapsulated mutant. Two interrelated hypothesis might explain these observations, a) increased IL-10 production in the absence of CPS erases differences in cytokine production (in the case of bmDCs) and/or reduce cytokine production (in the case of spleen DCs; b) higher and faster levels of non-encapsulated bacteria killing reduce or impair cytokine production, especially in the case of spleen DCs. The observed CPS regulatory role of DC functions might have important consequences in the immunopathogenesis of GBS infection. *In vivo* studies demonstrated that IL-12/IL-10 balance is important in controlling the cytokine production that leads to the evolution of GBS-induced pathology and have a major role in restricting bacterial growth during infection (37-39). In this regard, GBS internalization is largely required for modulation of both, the IL-12 and IL-10 pathways. *Staphylococcus aureus* induces IL-10 in macrophages after recognition of peptidoglycan-embedded lipopeptides in the bacterial-cell wall. It has been proposed that APC-peptidoglycan interaction may down-regulate inflammation when present in large quantities (40, 41). Thus, DC signaling triggered by GBS internalization may has an inherent plasticity to induce pro-inflammatory and anti-inflammatory responses depending on the level of cell wall exposition and degree of intracellular bacterial degradation.

Chemokines are also important in regulating innate and adaptive immune responses. GBS-exposed bmDCs and spleen DCs secreted high levels of the neutrophil chemoattractant CXCL1, as already reported with mouse macrophages (42). High levels of CXCL1 secretion might contribute to host innate defense against GBS but might also results in increased pathology. On the other hand, bmDC stimulated with GBS failed to produce significant levels of CXCL9 and produced low and delayed levels of the CXCL10 chemokine. In contrast, GBS-infected spleen DCs produced significant levels of both, CXCL9 and CXCL10, which might reflects the already reported diverse property of chemokine production among DC subsets (43). These two chemokines share the ability to signal through CXCR3, which is present on T cells and NK cells. Although up-regulation of *Cxcl10* gene expression was observed by DNA microarray analyses of mouse peritoneal macrophages (44), GBS was reported to be unable to induce CXCL10 secretion by these cells (42). A critical role of type I IFN-dependent CXCL10 has been identified in host defense during microbial sepsis by increasing neutrophil recruitment and function (45). Mancuso *et al.* reported that GBS induces type I IFN by DCs via a lysosomal TLR7-dependent pathway (13). This novel bacterial-recognition system operates in conventional DCs but not in macrophages. Thus, GBS modulation of this pathway in DCs might have important consequences for both innate and adaptive immune responses against this pathogen. Mancuso *et al.* suggested that by disrupting phagosomal maturation and/or integrity, bacterial pathogens may avoid not only direct killing but also immune recognition in lysosomal compartments and the subsequent establishment host-protective responses dependent on interferon-regulatory transcription factor-1 (13). In agreement with these results, CXCL10 production was almost completely abrogated by cytochalasin D treatment of GBS-infected cells, confirming that intracellular bacteria is required for activation of this pathway.

To conclude, our results show that DCs efficiently internalize GBS and might play a role in the development of host innate and adaptive immunity during an infection with this pathogen. However, the CPS of GBS differently modulates DC activation and function and contributes to bacterial intracellular survival. Finally, bmDCs and primary spleen DCs differ in some aspects of their responses upon infection, illustrating the importance of comparing different DC sub-populations when studying host–pathogen interactions.

Acknowledgments

We thank Dr. D. Takamatsu, National Institute of Animal Health, Tsukuba, Japan, for kindly providing plasmid pSET-4s. We are also grateful to Sonia Lacouture (Université de Montréal, Canada) for useful discussions and to Damian Clarke for reviewing the manuscript.

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through grant to MS (#342150-07). MS is the recipient of a Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ) Career Award. PL is the recipient of a Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) PhD Award. MPL is the recipient of a NSERC PhD Award.

SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental Table I. Bacterial strains, plasmids and oligonucleotide primers used in this study.

Strains/Plasmid/Primes	General characteristics	Source/Reference
<i>Escherichia coli</i>		
TOP 10	F- <i>mrcA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M5 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
Group B <i>Streptococcus</i>		
COH-1	Wild-type, highly encapsulated strain isolated from an infant with bacteremia. Serotype III	(12)
Δ <i>cpsE</i>	Non-encapsulated strain derived from strain COH-1. Deletion of the <i>cpsE</i> gene	This work
Plasmids		
pCR2.1	Ap ^r , Km ^r , <i>oriR</i> (f1) MCS <i>oriR</i> (ColE1)	Invitrogen
pSET-4s	Thermosensitive vector for allelic replacement. Replication functions of pG+host3, MCS <i>oriR</i> pUC19 <i>lacZ</i> Sp ^R	(15)
p4 Δ <i>cpsE</i>	pSET-4s carrying the construct for <i>cpsE</i> allelic replacement	This work
Oligonucleotide primers, sequence (5' – 3')		
GBScpsE-ID1	AGAATACTTCAATGCGATCCG	
GBScpsE-ID2	TCAAGATAGCCACGACTCC	
GBScpsE-ID3	AAGGCGATATGAGTTTAGCAG	
GBScpsE-ID4	CGCCATGTGTGATAACAATCTC	
GBScpsE-ID5	TGGAACATTAAAGGCTTGACG	
GBScpsE-ID6	CCTGTCCCGAGTAAACTACTACAACGTGTTTGAATCATCGC	
GBScpsE-ID7	GCGATGATTCAAACAGTTGTAGTAGTTTACTCGGGACAGG	
GBScpsE-ID8	TCCCCACTGTGACAAAAATC	

References

1. **Koenig JM, Keenan WJ.** 2009. Group B *Streptococcus* and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr Clin North Am* **56**:689-708.
2. **Edwards MS, Baker CJ.** 2005. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* **41**:839-847.
3. **Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, et al.** 2005. Structural and genetic diversity of Group B *Streptococcus* capsular polysaccharides. *Infect Immun* **73**:3096-3103.
4. **Davies HD, Adair C, McGeer A, Ma D, Robertson S, et al.** 2001. Antibodies to capsular polysaccharides of Group B *Streptococcus* in pregnant Canadian women: relationship to colonization status and infection in the neonate. *J Infect Dis* **184**:285-291.
5. **Doran KS, Nizet V.** 2004. Molecular pathogenesis of neonatal Group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Mol Microbiol* **54**:23-31.
6. **Carlin AF, Uchiyama S, Chang YC, Lewis AL, Nizet V, et al.** 2009. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood* **113**:3333-3336.
7. **Wennekamp J, Henneke P.** 2008. Induction and termination of inflammatory signaling in Group B streptococcal sepsis. *Immunol Rev* **225**:114-127.
8. **Maisey HC, Doran KS, Nizet V.** 2008. Recent advances in understanding the molecular basis of Group B *Streptococcus* virulence. *Expert Rev Mol Med* **10**:e27.
9. **Nagl M, Kacani L, Mullauer B, Lemberger EM, Stoiber H, et al.** 2002. Phagocytosis and killing of bacteria by professional phagocytes and dendritic cells. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**:1165-1168.
10. **Alvarez D, Vollmann EH, von Andrian UH.** 2008. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* **29**:325-342.
11. **Shortman K, Heath WR.** 2010. The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol Rev* **234**:18-31.
12. **Chaffin DO, Mentele LM, Rubens CE.** 2005. Sialylation of Group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression. *J Bacteriol* **187**:4615-4626.
13. **Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, et al.** 2009. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* **10**:587-594.
14. **Segura MA, Cleroux P, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* and Group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**:189-195.
15. **Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T.** 2001. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid* **46**:140-148.
16. **Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, et al.** 2011. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis* **204**:919-929.
17. **Segura M, Su Z, Piccirillo C, Stevenson MM.** 2007. Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression. *Eur J Immunol* **37**:1887-1904.
18. **van den Berg TK, Kraal G.** 2005. A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. *Trends Immunol* **26**:506-509.

19. **MacDonald AS, Straw AD, Bauman B, Pearce EJ.** 2001. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. *J Immunol* **167**:1982-1988.
20. **Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, et al.** 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* **223**:77-92.
21. **Hou WS, Van Parijs L.** 2004. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol* **5**:583-589.
22. **Ing R, Segura M, Thawani N, Tam M, Stevenson MM.** 2006. Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. *J Immunol* **176**:441-450.
23. **Valenti-Weigand P, Benkel P, Rohde M, Chhatwal GS.** 1996. Entry and intracellular survival of Group B streptococci in J774 macrophages. *Infect Immun* **64**:2467-2473.
24. **Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malevanets A, Saftig P, et al.** 2007. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J* **26**:313-324.
25. **Miller G, Pillarisetty VG, Shah AB, Lahrs S, Xing Z, et al.** 2002. Endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor overexpression in vivo results in the long-term recruitment of a distinct dendritic cell population with enhanced immunostimulatory function. *J Immunol* **169**:2875-2885.
26. **Banchereau J, Steinman RM.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245-252.
27. **Kapadia D, Sadikovic A, Vanloubbeeck Y, Brockstedt D, Fong L.** 2011. Interplay between CD8alpha+ dendritic cells and monocytes in response to *Listeria monocytogenes* infection attenuates T cell responses. *PLoS One* **6**:e19376.
28. **Costa A, Gupta R, Signorino G, Malara A, Cardile F, et al.** 2012. Activation of the NLRP3 inflammasome by group B streptococci. *J Immunol* **188**:1953-1960.
29. **Carlin AF, Chang YC, Areschoug T, Lindahl G, Hurtado-Ziola N, et al.** 2009. Group B *Streptococcus* suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5. *J Exp Med* **206**:1691-1699.
30. **Cornacchione P, Scaringi L, Fettucciari K, Rosati E, Sabatini R, et al.** 1998. Group B streptococci persist inside macrophages. *Immunology* **93**:86-95.
31. **Poyart C, Pellegrini E, Marceau M, Baptista M, Jaubert F, et al.** 2003. Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol Microbiol* **49**:1615-1625.
32. **Netea MG, Gijzen K, Coolen N, Verschuieren I, Figdor C, et al.** 2004. Human dendritic cells are less potent at killing *Candida albicans* than both monocytes and macrophages. *Microbes Infect* **6**:985-989.
33. **Lecours MP, Segura M, Lachance C, Mussa T, Surprenant C, et al.** 2011. Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. *Vet Res* **42**:72.
34. **Severi E, Hood DW, Thomas GH.** 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology* **153**:2817-2822.
35. **Spinosa MR, Progidia C, Tala A, Cogli L, Alifano P, et al.** 2007. The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells. *Infect Immun* **75**:3594-3603.
36. **Kolb-Maurer A, Unkmeir A, Kammerer U, Hubner C, Leimbach T, et al.** 2001. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Infect Immun* **69**:6912-6922.

37. **La Pine TR, Joyner JL, Augustine NH, Kwak SD, Hill HR.** 2003. Defective production of IL-18 and IL-12 by cord blood mononuclear cells influences the T helper-1 interferon gamma response to Group B Streptococci. *Pediatr Res* **54**:276-281.
38. **Puliti M, von Hunolstein C, Bistoni F, Mosci P, Orefici G, et al.** 2002. The beneficial effect of interleukin-12 on arthritis induced by Group B streptococci is mediated by interferon-gamma and interleukin-10 production. *Arthritis Rheum* **46**:806-817.
39. **Mancuso G, Cusumano V, Genovese F, Gambuzza M, Beninati C, et al.** 1997. Role of interleukin 12 in experimental neonatal sepsis caused by Group B streptococci. *Infect Immun* **65**:3731-3735.
40. **Duell BL, Tan CK, Carey AJ, Wu F, Cripps AW, et al.** 2012. Recent insights into microbial triggers of interleukin-10 production in the host and the impact on infectious disease pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **64**:295-313.
41. **Frodermann V, Chau TA, Sayedyahosseini S, Toth JM, Heinrichs DE, et al.** 2011. A modulatory interleukin-10 response to staphylococcal peptidoglycan prevents Th1/Th17 adaptive immunity to *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* **204**:253-262.
42. **Fan H, Williams DL, Zingarelli B, Breuel KF, Teti G, et al.** 2007. Differential regulation of lipopolysaccharide and Gram-positive bacteria induced cytokine and chemokine production in macrophages by Galpha(i) proteins. *Immunology* **122**:116-123.
43. **Fujita H, Asahina A, Sugaya M, Nakamura K, Gao P, et al.** 2005. Differential production of Th1- and Th2-type chemokines by mouse Langerhans cells and splenic dendritic cells. *J Invest Dermatol* **124**:343-350.
44. **Draper DW, Bethea HN, He YW.** 2006. Toll-like receptor 2-dependent and -independent activation of macrophages by Group B streptococci. *Immunol Lett* **102**:202-214.
45. **Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Delano MJ, Weinstein JS, Cuenca AG, et al.** 2010. Type I interferon signaling in hematopoietic cells is required for survival in mouse polymicrobial sepsis by regulating CXCL10. *J Exp Med* **207**:319-326.
46. **Graveline R, Segura M, Radzioch D, Gottschalk M.** 2007. TLR2-dependent recognition of *Streptococcus suis* is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness. *Int Immunol* **19**:375-389.

ARTICLE II

**"Encapsulated Group B *Streptococcus*
modulates dendritic cell functions via lipid
rafts and clathrin-mediated endocytosis"**

Paul Lemire, Mathieu Houde and Mariela Segura.

Publié dans: *Cell Microbiol.* **2012** Nov;14(11):1707-1719.

DOI: 10.1111/j.1462-5822.2012.01830.x.

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

Je suis le premier auteur de l'article. J'ai participé activement au design expérimental, aux expériences, à l'analyse des résultats et à l'écriture de l'article.

Encapsulated Group B *Streptococcus* modulates dendritic cell functions via lipid rafts and clathrin-mediated endocytosis

Paul Lemire, Mathieu Houde and Mariela Segura.*

Laboratory of Immunology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,
St-Hyacinthe, Québec, Canada

Running title : GBS modulates dendritic cell-endocytosis pathways

Keywords : Group B *Streptococcus*; capsular polysaccharide; endocytosis; cytokines;
dendritic cells

* Corresponding author. Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada. Tel.: +1 450 773 8521, ext. 0080; fax: +1 450 778 8108.

Abstract

Group B *Streptococcus* (GBS) capsular type III is an important agent of life-threatening invasive infections. It has been previously shown that encapsulated GBS is easily internalized by dendritic cells (DCs) and can persist inside these immune cells. The mechanisms underlying these processes are unknown. Here, colocalization studies and the use of endocytosis inhibitors and caveolin^{-/-} mice, demonstrated that GBS uses multiple endocytosis mechanisms to enter mouse DCs. The capsular polysaccharide (CPS) selectively drives GBS internalization via caveolae-independent but lipid raft-dependent pathways. Non-encapsulated bacteria failed to engage lipid rafts. GBS internalization by DCs also occurs via clathrin-mediated endocytosis in a process independent of bacterial CPS. Albeit caveolae are not required for GBS internalization, signalling events through caveolin-1 are involved in production of the inflammatory chemokine CCL2 by DCs infected with encapsulated GBS only. This study addresses for the first time endocytosis pathways implicated in DC internalization of encapsulated GBS and suggests a complex interplay between GBS and DCs, which was selectively modulated by the presence of CPS.

Abbreviations

Ab	antibody	GBS	Group B <i>Streptococcus</i>
APC	antigen-presenting cell	GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
bmDC	bone marrow-derived dendritic cell	IL	interleukin
CAV-1	caveolin protein 1	LAMP-1	lysosomal-associated membrane protein-1
CFU	Colony-forming unit	LDH	lactate deshydrogenase
CM	chloramphenicol	MβCD	methyl-β-cyclodextrin
CCL	chemokine ligand	MDC	monodansylcadaverin
CPS	capsular polysaccharide	MOI	multiplicity of infection
CPZ	chlorpromazin	Siglecs	sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand	TLR	Toll-like receptor
DC	dendritic cell	TNF	tumor necrosis factor
DYN	dynasore	WT	wild-type
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay		

Introduction

Group B *Streptococcus* (GBS) or *Streptococcus agalactiae* is a leading cause of life-threatening invasive bacterial infections of worldwide occurrence in pregnant women and infants, as well as the elderly and immune-compromised individuals (1, 2). All nine GBS capsular types that have been characterized (Ia, Ib, II–VIII), as well as the recently proposed serotype IX (3), can cause human infection. Type III GBS is one of the three major capsular types associated with invasive neonatal infection and is the most common type in GBS meningitis (2, 4). Different GBS serotypes arise from the synthesis of distinct capsular polysaccharide (CPS) repeat units. Notably, all characterized CPS types possess a terminal sialic acid (Neu5Ac). The structure of type III GBS CPS is formed by the monosaccharides glucose, galactose and *N*-acetylglucosamine into a unique repeating unit that contains a side chain terminated by sialic acid α 2,3 linked to galactose (5, 6). The sialylated CPS is recognized as the most important factor for GBS survival within the host (6) and has been suggested to inhibit the activation of the alternative complement pathway and to impair the bactericidal functions of neutrophils (7–10). In a recent work, we showed that mouse-derived dendritic cells (DCs) efficiently internalize encapsulated GBS, but the presence of CPS confers to GBS an intracellular survival advantage compared with a non-encapsulated mutant (11, 12) found GBS antigens in two distinct DC intracellular compartments: DNA⁺ late endosomes/phagosomes and DNA[−] phagolysosomes containing partially digested GBS material. All together, these observations suggest that divergent routes of entry are probably involved in GBS internalization by DCs.

Endocytosis pathways are divided into at least five classes on the basis of the molecular machineries that drive the process: (1) clathrin-dependent endocytosis (often referred to as receptor-mediated endocytosis); (2) caveolae-dependent endocytosis; (3/4) clathrin- and caveolae-independent endocytosis (which can be either lipid raft-dependent or independent); and (5) macropinocytosis (13). Mobilization of lipid rafts during GBS invasion of endometrial cells has been reported (14). A pioneering study suggested receptor-mediated endocytosis of GBS type III in macrophages by a mechanism partially dependent on the formation of clathrin-coated pits and the microtubulin network (15). Since DCs are recognized as the most powerful antigen-presenting cells (APCs) that initiate immune responses against pathogens (16), the strategic utilization of a specific endocytic pathway may provide to the pathogen not only a mechanism to avoid immunoclearance (13, 17, 18),

but also a strategy to shape the ensuing immune response. Thus, in this study, we used C57BL/6 mouse bone marrow-derived DCs (bmDCs) to investigate for the first time the endocytosis pathways engaged by GBS type III during its interaction with these important APCs. The role of CPS in these processes was evaluated using an isogenic non-encapsulated mutant.

Material and methods

Bacterial strains and growth conditions

Strain COH-1, a highly encapsulated type III GBS isolate extensively described in previous work (5, 12, 19), was used in this study as the WT strain. An isogenic non-encapsulated ($\Delta cpsE$) mutant, constructed and characterized in our previous work was also included (11, 20). GBS strains were grown on sheep blood agar plates at 37°C for 18 h. Isolated GBS colonies were inoculated in Todd–Hewitt Broth (THB; Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada), incubated for 16 h at 37°C with shaking. Working cultures for cell stimulation were obtained by inoculating 100 μ l of the 16 h culture into 10 ml of THB followed by incubation for 5 h at 37°C with shaking. Bacteria were washed twice in PBS, pH 7.3 and appropriately diluted in complete cell culture antibiotic-free medium. The number of cfu ml⁻¹ in the final suspension was determined by plating samples onto Todd–Hewitt agar (THA) using an Autoplate 4000 Automated Plater (Spiral Biotech, Norwood, MA).

Mouse strains and generation of bone marrow-derived dendritic cells

BmDCs were generated from female C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). In some experiments, B6.Cg-Cav1^{tm1Mls}/J mice possessing a caveolin protein-1 targeted mutation (referred here as CAV-1 KO) and their respective control mice C57BL/6J were used (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). All experiments involving mice were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the Animal Welfare Committee of Université de Montréal. BmDCs were produced according to a technique previously described (11, 21), and cultured in complete medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated fetal

bovine serum, 10 mM Hepes, 2 mM L-glutamine and 50 μ M 2-mercaptoethanol (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Cell purity was routinely $\geq 88\%$ CD11c^{high} and F4/80^{dim} cells as determined by FACS analysis (11, 22), values that were in agreement with those reported in other studies (23-25).

Cell toxicity test

Cell toxicity induced by different GBS strains and concentrations was evaluated by measuring the release of lactate dehydrogenase enzyme (LDH) with the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI) as previously described (22). LDH results showed that GBS strains induced significant cytotoxicity ($> 10\text{--}15\%$) after 6 h of incubation when used at concentrations higher than 10^6 cfu ml⁻¹ (11). No differences in toxicity levels were observed between the mutant strain and the WT strain (data not shown).

Bacterial internalization assay

BmDCs at a concentration of 10^6 cells ml⁻¹ were infected with 10^6 cfu ml⁻¹ of different GBS strains (initial MOI:1), and incubated for 60 min at 37°C with 5% CO₂. After incubation, 100 μ g ml⁻¹ of gentamicin and 5 μ g ml⁻¹ of penicillin G (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) were added to kill extracellular bacteria. It has been demonstrated that these antibiotics do not penetrate eukaryotic cells under these conditions (15), and preliminary studies have shown that these concentrations of antibiotics were able to kill any remaining extracellular bacteria (11). After 1 h antibiotic treatment, cells were washed 3 times with PBS, lysed with sterile water and viable intracellular streptococci enumerated by quantitative plating of serial dilutions of the lysates on THA. The results were expressed as cfu ml⁻¹ of recovered intracellular viable bacteria.

Inhibition studies of endocytosis pathways

All inhibitors used for evaluation of endocytosis pathways were tested by the LDH assay for absence of cytotoxicity at the doses and incubation time periods used in this study. An inhibitor was considered cytotoxic if viability after treatment was $< 90\%$ that of untreated controls. Since inhibitors might also cause viable cell detachment from plate wells and loss

during washing steps, viable cell loss was also monitored as described in Table 1. Inhibitors did not affect GBS strains viability or growth (data not shown).

Table 1. Inhibitors of endocytosis

Name	Dose	Pretreated (min) ^b	Phagocytosis test ^a					Action/ mechanism
			Bacteria-cell contact (min)	ATB treatment (min)	Drug removal	Cell toxicity (%)	Viable cell detachment (%) ^c	
Methyl- β -cyclodextrin	5 mM	30	60	60	No	0	< 5	Extracts cholesterol from plasma membrane and compromises the integrity of lipid rafts
	10 mM	15	60	60	Yes	0	< 10	
Monodansyl-cadaverin	50, 75, 100 μ M	30	60	60	No	< 4	< 12	Blocks the formation of 'clathrin-coated pits'
Chlorpromazine	5, 10, 25 μ M	30	60	60	Yes	< 7	0	Inhibitor of assembly and recycling vesicles with clathrin
Dynasore	20, 40, 80 μ M	30	60	60	No	< 10	< 7	Inhibitor of the GTPase, dynamin

- a.** The phagocytosis test consists of a 60 min of bacterial-cell contact (MOI: 1), following by addition of antibiotics (ATB) to kill extracellular bacteria for 60 min. ATB were added either without any washing step (no removal of drug during the 60 min of ATB treatment) or after a washing step (drug removed). After ATB treatment, cells are washed three times and lysed for intracellular bacterial enumeration.
- b.** Time of drug pre-treatment prior to infection of cells for the phagocytosis test.
- c.** Cell loss (detachment from wells) was monitored by quantification of mechanically released LDH from treated cell plotted against a standard curve performed with serial dilutions of untreated cells.

To evaluate the role of lipid rafts in GBS uptake by bmDCs, M β CD (Sigma-Aldrich) at concentrations of 5 and 10 mM were added to bmDCs for 30 min or 15 min prior to bacterial infection respectively. The highest inhibitor dose was, however, removed after the 60 min infection period for the remaining steps of the phagocytosis test due to toxic effects at longer incubation times. The role of clathrin-mediated endocytosis was evaluated using the inhibitor MDC at concentrations of 50, 75 and 100 μ M and the inhibitor CPZ at concentrations of 5, 10 and 25 μ M (Sigma-Aldrich). MDC was added to bmDCs for 30 min prior to bacterial infection and phagocytosis evaluated as described above. CPZ was added to bmDCs for 30 min prior to bacterial infection. CPZ was, however, removed after the 60 min infection period for the remaining steps of the phagocytosis test due to toxic effects at longer incubation times. To evaluate the role of dynamin in GBS uptake by bmDCs, DYN (Enzo Life

Sciences, Farmingdale, NY) at concentrations of 20, 40 and 80 μM was added to cells for 30 min prior to bacterial infection and phagocytosis evaluated as described above. Table 1 summarizes inhibitor doses and conditions.

Evaluation of CCL2 chemokine production by bmDCs

BmDCs were resuspended at 10^6 cells ml^{-1} in complete medium and stimulated with 1 μM CpG (ODN 1826, Coley Pharmaceutical, Düsseldorf, Germany), used as positive control, or different GBS strains (10^6 cfu ml^{-1} ; initial MOI:1). After 2 h of bmDC-GBS infection, chloramphenicol (CM, 12 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Sigma-Aldrich) was added to the culture to prevent cell toxicity. CM is a bacteriostatic agent, keeping a low and controlled level of bacteria through the incubation period ($\sim 5 \times 10^4$ cfu ml^{-1}). Time of bacteria–cell contact prior to CM treatment and minimal CM dose required were selected based in our previous work (11). After total 16 h of incubation, supernatants were collected for CCL2/MCP-1 quantification by ELISA as described (22). Non-stimulated cells served as negative control. For comparative purposes, the levels of the cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-23p19, TNF- α , CXCL1/KC and CXCL10/IP-10 were also evaluated by ELISA in culture supernatants (11, 22). In selected experiments, cytochalasin D at 2.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ was added to bmDCs for 30 min prior to bacterial infection as previously described (11). All solutions and bacterial preparations used in these experiments were tested for the absence of endotoxin using a Limulus amoebocyte lysate test (Pyrotell, STV, Cape Cod, MA) with a sensitivity limit of 0.03 EU ml^{-1} .

Confocal microscopy

For immunofluorescence studies, bmDCs, treated or not with endocytosis inhibitors as described above (Table 1), were placed on coverslips and infected with different GBS strains. Unless specified, after 2 h of bacteria–cell contact, coverslips were washed with PBS three times to remove non-associated bacteria. Depending on the antibody used, cells were fixed with methanol/acetone (80:20) for 20 min at -20°C or with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature followed by permeabilization with 0.1% saponin. Cells were then washed and blocked for 10 min. Coverslips were incubated for 1 h with rabbit anti-GBS serum, with rat anti-mouse lysosomal-associated membrane protein-1 (LAMP1) mAb (clone 1D4B, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA), with mouse anti-Caveolin-1 mAb (Clone 2297, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) or mouse anti-Clathrin heavy

chain mAb (Clone X22, Abcam, Cambridge, MA). After washing, coverslips were incubated with different combination of secondary antibodies Alexa-Fluor 488 (green), Alexa-Fluor 568 (red), or Alexa-Fluor 633 (far-red) goat anti-rabbit IgG, goat anti-rat IgG or goat anti-mouse IgG (Invitrogen) for 30 min, washed and mounted on glass slides with moviol containing DABCO and DAPI to stain the nuclei. Samples were observed with an Olympus FluoView™ FV1000 confocal laser scanning microscope. Confocal microscopy images were obtained by scanning 6 times the image plane (x/y 127.041 μm ; 0.159 μm /pixel), and analysed using Fluoview software (Markham, ON, Canada).

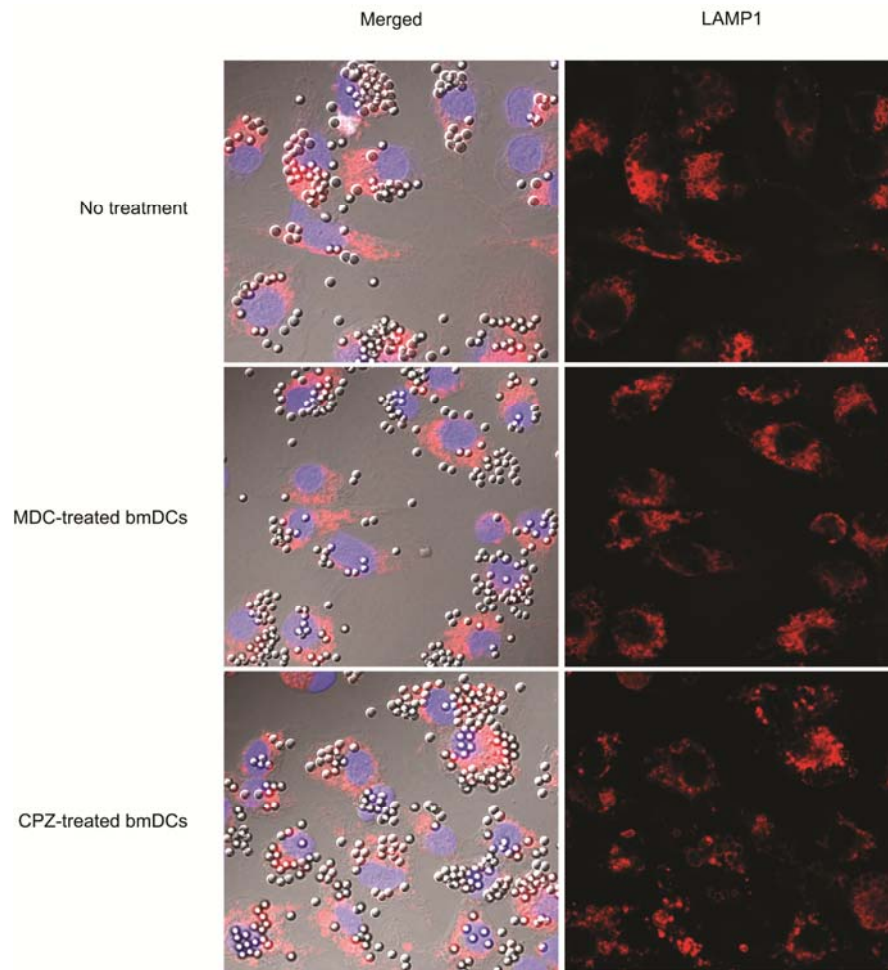
Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM. Data were analysed for significance using Student's unpaired *t*-test. A *P*-value of < 0.05 was used as a threshold for significance. All experiments were repeated at least three times. Confocal microscopy data quantification and statistical analysis of colocalization were performed using the Fluoview software. Integrated fluorescence intensities for each fluorescence channel were analysed. Briefly, 60 cells were randomly selected for each condition. Average integrated fluorescence was calculated by the software and the obtained ratio was normalized according to DAPI/Nuclei channel variance between samples. Colocalization analyses were performed using the same software. The background correction was performed using the threshold values. The calculations are based on Pearson's correlation coefficient (R_r), which describes the degree of overlap between two different signals. The two coefficients C_{red} and C_{green} are proportional to the amount of fluorescence of the colocalizing object in each region of interest, relative to the total amount of fluorescence in that region. Their values range from zero and one, and a value of zero means that there is no colocalization while a value close to one means that there is colocalization.

Results and discussion

Clathrin-mediated endocytosis contributes to GBS internalization by DCs independently of the presence of bacterial CPS

In our previous work we showed that both bmDCs as well as primary spleen DCs efficiently internalize both the encapsulated GBS strain and the non-encapsulated mutant $\Delta cpsE$. Phagocytosis levels increased over time, but at short incubation times the $\Delta cpsE$ mutant was significantly more internalized than the wild-type (WT) strain, though differences were lost after longer incubation times. Once internalized, both non-encapsulated and encapsulated GBS reside in LAMP1-enriched phagosomes, but the latter displays stronger survival capacity (11). Thus, we became interested in the possible mechanisms of opsonin-independent internalization of GBS by this type of APCs. Since a previous work suggested a partial role of clathrin-coated pits in GBS type III internalization by macrophages (15), we first evaluated the involvement of this pathway during DC infection by GBS. There are a variety of ways to perturb clathrin-mediated internalization, including the use of small molecules, such as monodansylcadaverin (MDC) and chlorpromazine (CPZ), which reduce available clathrin for assembly at the cell surface (26). We first confirmed the specificity of the inhibitors by lack of inhibition of phagocytosis of 2 μ m-latex beads by bmDCs (Supplemental Fig. 1). MDC and CPZ partially inhibited WT GBS internalization in a dose-dependent manner, reaching a 23- and 15-fold decrease at maximal dose of MDC and CPZ respectively (Fig. 1A and B). Internalization of $\Delta cpsE$ mutant strain was also significantly affected when bmDCs were pretreated with the highest dose of either inhibitor. Maximal inhibition observed for the $\Delta cpsE$ mutant strain corresponded to a 10-fold decrease in internalization levels, which was, however, significantly lower than that observed for WT GBS ($P < 0.05$) (Fig. 1A and B).



Supplemental Fig. 1. Phagocytosis of latex beads is not affected by clathrin inhibitors.

Bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs) were treated with monodansylcadaverin (MDC, 100 μ M) or chlorpromazine (CPZ, 25 μ M), two inhibitors of clathrin-mediated endocytosis, for 30 min prior to addition of 2 μ m-latex beads (10^7). After an incubation period of 30 min, cells were fixed and labelled with an antibody specific for LAMP1 (Alexa-Fluor 568, red). DAPI was used to stain the nuclei (blue). Images are representative of two independent experiments.

The large GTPase dynamin is essential for clathrin-dependent coated vesicle formation. It is required for membrane budding at a late stage during the transition from a fully formed pit to a pinched-off vesicle (27). Thus, we used dynasore (DYN), a potent inhibitor of dynamin, to further evaluate the contribution of clathrin-coated pits in GBS internalization (28). Dynasore significantly inhibited WT GBS and mutant strain internalization in a dose-dependent manner, reaching 11- and 8-fold decrease at maximal dose of inhibitor respectively (Fig. 1C). Confocal microscopy confirmed these observations,

as fewer WT cocci were observed inside phagosomes of MDC- or CPZ-treated bmDCs (Fig. 1D). To further dissect the role of clathrin in GBS internalization, confocal microscopy was also performed using a mAb specific to mouse clathrin. As shown in Fig. 1E, encapsulated GBS resided in clathrin⁺ compartments, with maximal staining observed at 30 min of bacteria–cell contact.

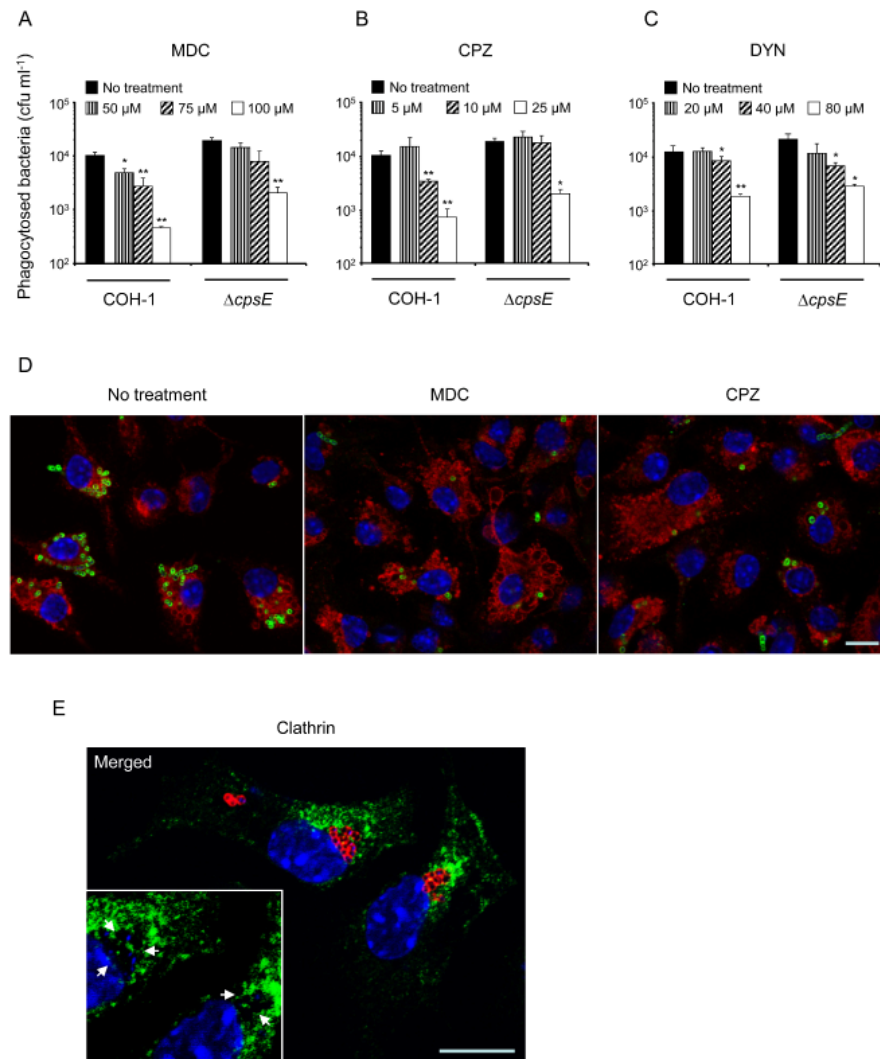


Fig. 1. Role of clathrin-mediated endocytosis in GBS internalization by DCs.

(A–C) Bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs) were treated with (A) monodansylcadaverin (MDC) or (B) chlorpromazine (CPZ); two inhibitors of clathrin-mediated endocytosis; or (C) dynasore (DYN), a potent inhibitor of dynamin, at different doses prior to bmDC infection with wild-type GBS strain COH-1 or the $\Delta cpsE$ mutant (10^6 cfu ml⁻¹, initial MOI:1) for 60 min (see Table 1 for methodology details). Numbers of internalized bacteria were determined by quantitative plating after 1 h of antibiotic treatment to kill extracellular bacteria and expressed as

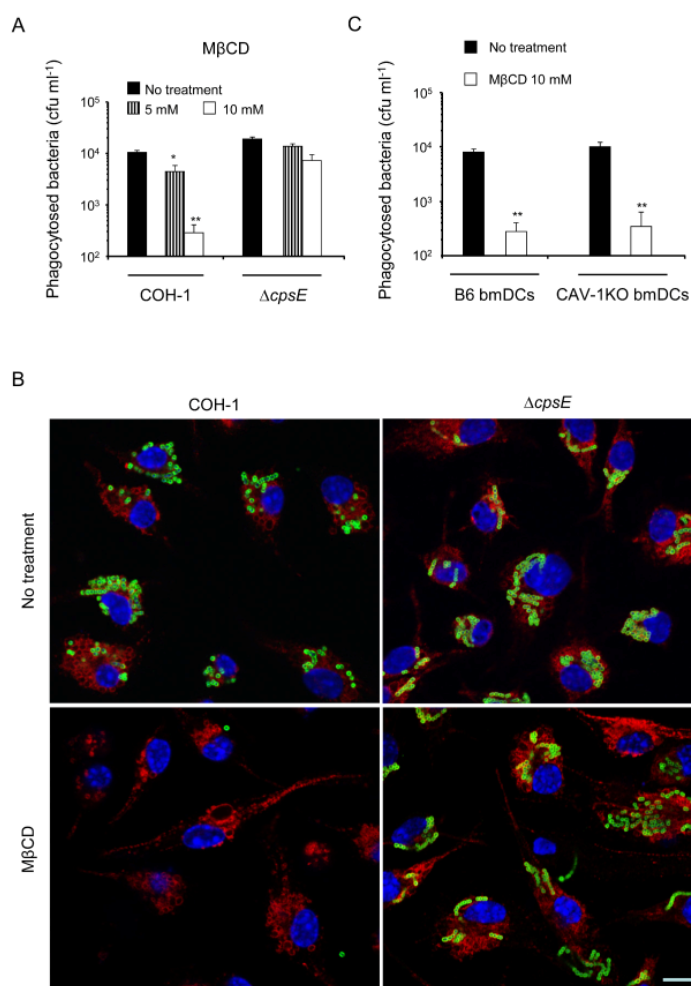
cfu recovered bacteria per ml (means \pm SEM) obtained from four independent experiments. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$ indicates statistically significant differences between non-treated cells versus treated cells. **(D)** Confocal laser scanning microscopy studies of wild-type GBS internalization by non-treated, MDC-treated or CPZ-treated bmDCs. After a bacteria–cell contact of 2 h, cells were fixed and labelled with serum against GBS (Alexa-Fluor 488, green) and an antibody specific for LAMP1 (Alexa-Fluor 568, red). DAPI was used to stain the nuclei (blue). Scale bar, 10 μ m. **(E)** Localization of clathrin protein by confocal laser scanning microscopy. After a bacteria–cell contact of 30 min, cells were fixed and labelled with serum against GBS (Alexa-Fluor 568, red) and a mAb specific for clathrin heavy chain (Alexa-Fluor 488, green). DAPI was used to stain nuclei or bacterial DNA (blue). Merge of optical sections shows intracellular localization of wild-type GBS inside clathrin+ compartments. Insert shows green optical sections with the presence of bacterial DNA surrounded by clathrin+ staining (white arrows). Images are representative of three independent experiments. Scale bar, 10 μ m.

The importance of clathrin-mediated endocytosis in bacterial interactions with host cells has received a lot of attention in the last few years (29). The best well-know pathogen that uses clathrin-mediated endocytosis is *Listeria monocytogenes*. Invasion of non-phagocytic cells by several other bacterial species was also reported to be influenced by clathrin-mediated endocytosis (29, 30). To the best of our knowledge, studies addressing the role of this pathway in bacterial up-take by professional phagocytes and DCs are limited or inexistent respectively (30). In the case of GBS, it was shown that a clathrin inhibitor affect, at least in part, the internalization of GBS by a macrophage cell line (15). In contrast, phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* by macrophages was unaffected by dynasore pretreatment (31). By using two distinct inhibitors of clathrin-mediated endocytosis and an inhibitor of dynamin, combined with clathrin colocalization studies we showed here that this pathway is also involved in DC internalization of both encapsulated and non-encapsulated GBS. Nevertheless, this pathway does not seem to be the unique or the major route of GBS entry into DCs.

The presence of CPS provides to the bacteria the capacity to engage lipid raft-dependent endocytosis mechanisms

Since only partial inhibition of GBS endocytosis was observed with clathrin inhibitors, other pathways might also be involved. Lipid rafts are microdomains rich in cholesterol that appear to have multiple functions, including membrane transport and signal transduction.

Different raft domains might coexist, as for example caveolar (caveolin-containing) rafts and non-caveolar rafts. As a previous study reported that GBS exploits lipid rafts to invade human endometrial cells (14), we evaluated the importance of these membrane domains in GBS internalization by DCs by using methyl- β -cyclodextrin (M β CD), a water-soluble cyclic oligosaccharide that selectively depletes membrane cholesterol and disrupt lipid rafts (26). As shown in Fig. 2A, bmDC pretreatment with M β CD significantly affected WT GBS internalization. While the inhibition was dose-dependent for the WT strain, internalization of $\Delta cpsE$ mutant strain was not significantly affected even at the highest inhibitor dose. In fact, at a dose of 10 mM, M β CD induced a 40-fold decrease of WT GBS internalization levels compared with only a fourfold decrease for the mutant strain. Higher inhibitor doses could not be tested due to toxic effects. Confocal microscopy confirmed the potential role of lipid



rafts in encapsulated WT GBS internalization, as only few WT cocci were observed inside phagosomes of M β CD-treated bmDCs (Fig. 2B). Although stringent depletion of cholesterol from cell membranes is likely to have other effects beyond disruption of raft organization at the plasma membrane, under our controlled assay conditions cholesterol perturbation had no significant effects on other endocytosis pathways as internalization of the non-encapsulated mutant strain by bmDCs was poorly affected by M β CD treatment (Fig. 2B).

Fig. 2. Role of lipid rafts and caveolae/caveolin-1 in GBS internalization by DCs.

(A) Bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs) were treated with methyl- β -cyclodextrin (M β CD) a disruptor of lipid rafts, at different doses prior to bmDC infection with wild-type GBS strain COH-1 or the $\Delta cpsE$ mutant (10^6 cfu ml⁻¹, initial MOI:1) for 60 min (see Table 1 for

methodology details). Numbers of internalized bacteria were determined by quantitative plating after 1 h of antibiotic treatment to kill extracellular bacteria and expressed as cfu recovered bacteria per ml (means \pm SEM) obtained from four independent experiments. **(B)** Confocal laser scanning microscopy studies confirm differences in internalization levels of wild-type GBS strain COH-1 and the $\Delta cpsE$ mutant by M β CD-treated bmDCs, compared with control cells (no treatment). After a bacteria–cell contact of 2 h (initial MOI:1), cells were fixed and labelled with serum against GBS (Alexa-Fluor 488, green) and an antibody specific for LAMP1 (Alexa-Fluor 568, red). DAPI was used to stain the nuclei (blue). Images are representative of three independent experiments. Scale bar, 10 μ m. **(C)** BmDCs derived from C57BL/6J (B6) or caveolin-1 deficient (CAV-1 KO) mice were pretreated or not with M β CD (10 mM) prior to bmDC infection with wild-type GBS strain COH-1 (10^6 cfu ml $^{-1}$, initial MOI:1) for 60 min. Numbers of internalized bacteria were determined by quantitative plating after 1 h of antibiotic treatment to kill extracellular bacteria and expressed as cfu recovered bacteria per ml (means \pm SEM) obtained from three independent experiments. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$ indicates statistically significant differences between non-treated cells versus treated cells.

Several studies have demonstrated that a wide variety of pathogens target lipid rafts to enter host cells as an infectious strategy (17, 18). Furthermore, this route of entry may provide protection from the intracellular degradative lysosomal pathway (18, 32, 33). Bacteria like *Shigella*, *Salmonella*, FimH-expressing *Escherichia coli* and *Listeria* require lipid rafts or the presence of their target receptors within lipid rafts for entry into host cells (17, 32, 34, 35). In the case of FimH-expressing *E. coli* a role for caveolae has also been demonstrated (13). For GBS, the CPS seems to be important for the recognition of GBS via lipid rafts. Indeed, the internalization of the non-encapsulated strain was poorly compromised by disruption of lipid rafts. In the mutant strain, the absence of CPS may uncover bacterial surface proteins or cell wall components, which facilitate bacterial recognition and internalization via other pathways. Receptors involved in encapsulated GBS recognition within DC lipid raft domains are unknown. Sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins (Siglecs) have been reported to mediate cargo internalization by cholesterol/lipid raft endocytosis pathways, including internalization of sialylated *Neisseria meningitidis* (36). In this regard, it has been reported that GBS sialylated CPS engages neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response (8). The integrin CD11b/CD18 may also be one of potential receptors exploited by GBS in lipid rafts. This integrin, which is recruitable to lipid rafts, has been shown to mediate non-opsonic uptake of encapsulated GBS by macrophages (37, 38).

Encapsulated GBS endocytosis by DCs is not dependent on caveolae formation

As mentioned above, caveolae are a subset of lipid rafts at the plasma membrane that are characterized by their 'flask-like' morphology and are defined by the presence of the cholesterol-binding protein caveolin. As for non-caveolar rafts, caveolin-containing rafts are the target of pathogens for entry into host cells (32, 39). Besides lipid raft perturbation, extraction of cholesterol with M β CD treatment has been shown to decrease the number of caveolae on the plasma membrane and thus, commonly used as an inhibitor of this pathway. However, this effect might depend on the M β CD dose used (26). Thus, to precisely dissect the implication of caveolae in GBS internalization by DCs, we used two different experimental approaches. First, we infected bmDCs derived from caveolin protein-1 knock-out mice (CAV-1 KO). The caveolin-1 protein was reported to be a key structural protein that organizes caveolae platforms; as such the absence of this protein prevents formation of caveolae (39). At 60 min of bacteria–cell contact [initial multiplicity of infection (moi): 1], internalization levels of encapsulated WT GBS by CAV-1 KO bmDCs were similar to those observed with control bmDC (Fig. 2C). These observations were confirmed by confocal microscopy (data not shown). The non-encapsulated $\Delta cpsE$ mutant strain showed similar results (data not shown). This result was expected since lipid raft disruption had little effect on mutant strain uptake (Fig. 2B). To rule out the possibility that the conditions used for the phagocytosis assay underestimated the relative role of caveolae in encapsulated GBS internalization, we performed the phagocytosis assay with different initial moi and infection times (1, 0.1 and 0.01 MOI at 15, 30, 60, 90 and 120 min of bacteria–cell contact). No differences were observed between CAV-1 KO and control bmDCs at any condition tested (data not shown). To evaluate whether M β CD can still inhibit encapsulated GBS internalization in the absence of caveolae, we pretreated CAV-1 KO bmDCs with 10 mM M β CD and compared the inhibition levels with those observed in M β CD-treated control bmDCs. As shown in Fig. 2C, inhibition levels were equivalent suggesting that M β CD is probably blocking a caveolae-independent pathway. Finally, we performed confocal microscopy in order to evaluate whether GBS resides in caveolin-1 vacuoles using a mAb specific to mouse caveolin-1. In control cells, caveolin-1 protein was found either at the cell surface membranes or as cytoplasmic agglomerates close to the nucleus (perinuclear, Golgi-like distribution), as reported (39). In infected cells, caveolin-1 was found in close association with GBS at the cell membrane or at perinuclear sites. However, no clear formation of caveolin-1+ vesicles surrounding GBS was observed. Altogether, these results

suggest that GBS might interact with caveolin-1 protein, but caveolae formation is not required for GBS internalization (see below, Fig. 3A).

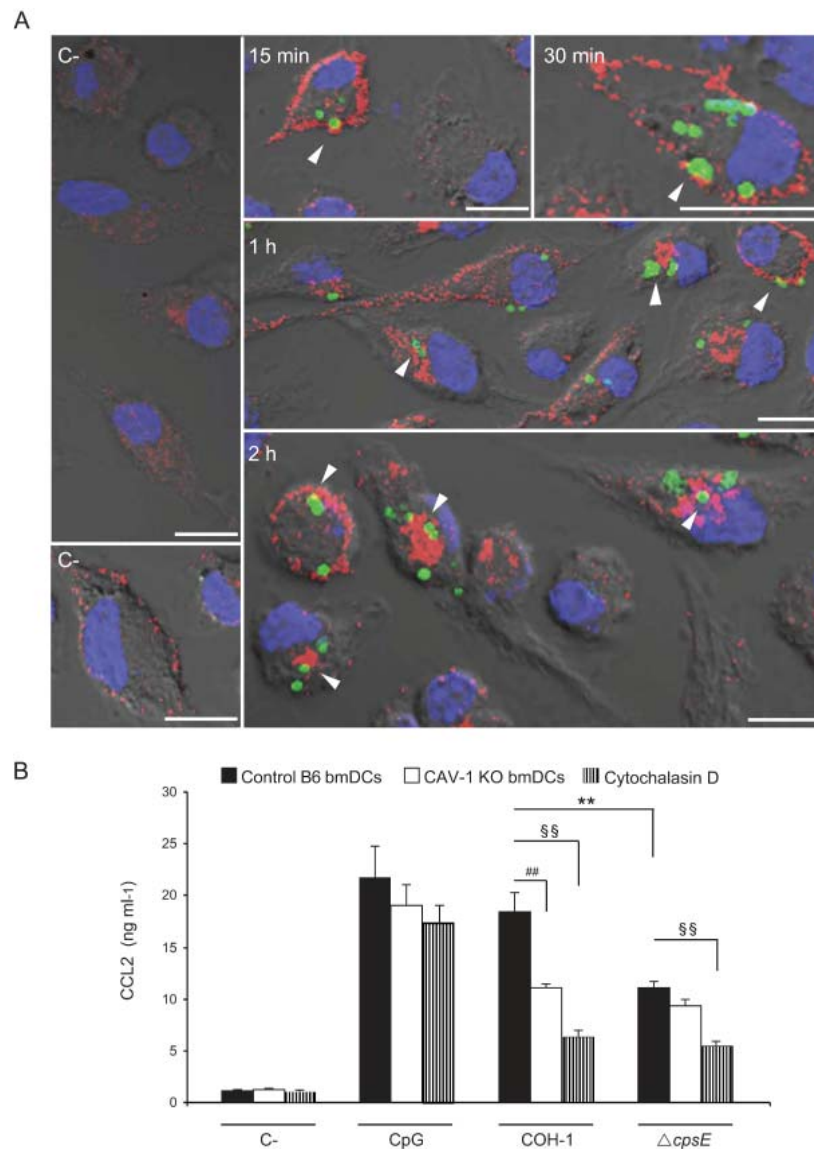


Fig. 3. Role of caveolin-1 in GBS modulation of DC activation.

(A) Colocalization of caveolin-1 protein and GBS by confocal laser scanning/DIC microscopy. Bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs) derived from C57BL/6 were infected with wild-type GBS strain COH-1 for 15 min, 30 min, 1 h and 2 h. Cells were fixed and labelled with serum against GBS (Alexa-Fluor 488, green) and a mAb specific for caveolin-1 (Alexa-Fluor 568, red). DAPI was used to stain the nuclei (blue). White arrows show caveolin-1 and GBS colocalization at either the cell surface membrane or at perinuclear sites (yellow colour due to red-green overlay). Non-stimulated C57BL/6 bmDCs served as negative controls (C-) to show basal

caveolin-1 expression. Scale bar, 10 μm . **(B)** BmDCs derived from C57BL/6J (B6) or caveolin-1 deficient (CAV-1 KO) mice were stimulated with CpG (1 μM), wild-type GBS strain COH-1 or ΔcpsE mutant strain (10^6 cfu ml^{-1} , initial MOI:1). After 2 h of bmDC–GBS infection, a bacteriostatic agent (chloramphenicol, 12 $\mu\text{g ml}^{-1}$) was added to the culture to prevent cell toxicity. Cytochalasin d-treated B6 bmDCs (2.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 30 min prior to infection) were also infected as described above. Supernatants were then harvested after 16 h of incubation and CCL2 production quantified by ELISA. Non-stimulated cells served as negative control (C–). Data are expressed as mean \pm SEM (in ng ml^{-1}) from three independent experiments. ** $P < 0.01$ indicates statistically significant differences between wild-type strain versus ΔcpsE mutant strain. ## $P < 0.01$ indicates statistically significant differences between B6 bmDCs and CAV-1 KO bmDCs. §§ $P < 0.01$ indicates statistically significant differences between cytochalasin d-treated bmDCs and non-treated B6 bmDCs.

In contrast to GBS, *S. pyogenes* and *Streptococcus uberis* use caveolae as an entry-port into epithelial and endothelial cells (40, 41). *Chlamydia trachomatis* is also thought to exploit caveolae as a means of entry into both phagocytic and non-phagocytic cells (32), and lack of caveolin-1 on neutrophils decrease the phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* (42). Our data suggest that despite caveolin-1 colocalization with GBS (Fig. 3A), caveolae formation is not essential for GBS internalization by DCs. Indeed, M β CD-cholesterol depletion in CAV-1 KO bmDCs suggests that a caveolin-independent but lipid raft-dependent pathway is involved in encapsulated GBS up-take by DCs. We cannot, however, rule out the possibility that in normal DCs internalization occurs through both caveolae and lipid rafts, but in absence of caveolin the internalization is directed through lipid rafts only. Redundancy is a common event in many Gram+ pathogens (13).

Altogether, our results suggest that GBS uses multiple endocytosis mechanisms to entry DCs and CPS seems to selectively drive bacteria through different pathways. Therefore, encapsulated GBS is internalized by DCs via lipid raft-dependent pathways, with minor implication of clathrin-mediated endocytosis. In the absence of CPS, non-encapsulated GBS fails to engage lipid raft-dependent pathways and its entry into DCs is partially driven by clathrin-mediated endocytosis. Other compensatory pathways might also be involved, including phagocytosis and constitutive non-clathrin endocytosis pathways (26).

Encapsulated GBS targets caveolin-1 signalling platform to induce CCL2 production by DCs

Among several cytokines tested (11), encapsulated GBS induced significantly higher levels of CCL2 production than the $\Delta cpsE$ mutant (Fig. 3B), suggesting that CPS components might specifically contribute to CCL2 activation. Caveolin may function as a scaffolding protein to organize and concentrate inactive signalling molecules for regulated activation by appropriate receptors and to facilitate crosstalk between distinct signalling cascades (39). Furthermore, the protein caveolin-1 itself can be tyrosine phosphorylated during certain signalling events (32). These observations prompt us to test the hypothesis that encapsulated GBS modulates CCL2 production by caveolin-1 signalling while being internalized through lipid rafts. To this aim, we compared cytokine production induced by GBS infection of CAV-1 KO bmDCs. Among nine cytokines tested (see *Material and methods*), CCL2 was the only one significantly affected by the absence of caveolin-1 (Fig. 3B). Indeed, a 40% inhibition of CCL2 production induced by encapsulated WT GBS was observed after infection of CAV-1 KO bmDCs compared with control bmDCs ($P < 0.01$). On the other hand, CCL2 production induced by the non-encapsulated mutant was not affected by the absence of caveolin-1. As mentioned above, we also performed sequential laser imaging (which prevents spectral overlap of fluorophores) in order to evaluate whether caveolin-1 colocalizes at the site of WT GBS infection (Fig. 3A). At early time points (15 and 30 min), colocalization of encapsulated GBS was observed at bacteria–cell surface contact points, whereas at later time points (1 and 2 h), GBS was mainly observed associated to caveolin-1 at perinuclear sites, as shown in the merged images (Fig. 3A, yellow). The Pearson's coefficient for colocalization of caveolin-1 and GBS was calculated using the Fluoview software. We found a high degree of colocalization, with an R_r value of 0.846 ± 0.06 , confirming significant overlap of fluorescence signals. It is interesting to note that levels and intensity of caveolin-1 staining were higher in infected cells (showing GBS bacteria) than in non-infected cells within the same sample. This probably suggests upregulation of caveolin-1 expression in infected cells. To dissect whether signalling events through caveolin-1 occur upon contact or during GBS endocytosis processes, we performed activation studies in the presence of cytochalasin D, which was previously shown to completely block GBS phagocytosis by bmDCs (11). As shown in Fig. 3B, cytochalasin D pretreatment of cells prior to WT GBS infection strongly reduced CCL2 production. On the other hand, CCL2 production induced by the non-encapsulated mutant was partially affected by cytochalasin D pretreatment ($75 \pm 3\%$ versus $51 \pm 4\%$ of inhibition respectively),

suggesting that in the absence of CPS, CCL2 production is also mediated by surface-receptor signalling activation.

One of the consequences of bacterial interaction with DCs is the induction of their activation (12). Encapsulated GBS was shown to trigger DC release of several cytokines, including CCL2 (11). CCL2 is an important chemokine which promote the infiltration and activation of cells of the monocyte-macrophage lineage, and has been associated to clinical sings of GBS sepsis in neonates (43). Interestingly, encapsulated GBS induces higher production levels of this chemokine than the non-encapsulated mutant, suggesting that CPS is involved in signalling events leading to enhanced CCL2 expression via a specific pathway. Likewise, the sialylated CPS of *Streptococcus suis*, which shares structural similitude with GBS CPS type III, has been shown to induce CCL2 production by phagocytes via a Toll-like receptor/myeloid differentiation factor-88-independent pathway (44, 45). We showed here that, albeit not required for bacterial internalization, caveolin-1-bearing membrane domains may be critical in mediating one (CCL2) or more of DC responses to stimulation by encapsulated GBS. Experiments using cytochalasin D suggest that signalling events through caveolin-1 occur mainly during encapsulated GBS endocytosis processes. In fact, caveolin-1 is an unusual protein not only found in the cell membrane, but also localized intracellularly as part of vesicle membranes, the endoplasmic reticulum, or free within the cytosol (39). Similarly to our results, infection of CAV-1 KO macrophages with *Salmonella enterica* did not result in differences in bacterial internalization but macrophages displayed a deregulated cytokine response (46). As observed in GBS-infected DCs, expression of caveolin-1 has been shown to be upregulated in response to LPS suggesting an important role for this protein in regulating host responsiveness (47). It is unclear whether encapsulated GBS entry through lipid rafts facilitates caveolin-intracellular signalling or the latter facilitates activation of known pattern recognition receptors. Studies on LPS activation of macrophages have shown that caveolin-1 appears to localize to two cellular compartments, one associated with lipid rafts and a second associated with TLR4 (48). It has been reported that disruption of lipid raft/caveolar function inhibits the ability of bacterial lipids that target TLR4 and TLR2 to increase synthesis of chemokines (49). The contribution of caveolin-1 mediated CPS induction of CCL2 production in the immunopathogenesis of GBS infection warrants further investigation.

To conclude, our results show that encapsulated GBS mobilizes different components of the DC endocytic machinery, which might result in differential modulation of DC functions. Indeed, the route of bacterial uptake by APCs can influence the repertoire of epitopes presented to T cells (50, 51). Lipid rafts appear to be the preferred site for encapsulated GBS entry. A possible advantage of invasion through lipid rafts could be the avoidance of intracellular degrading mechanisms (12, 32, 33). This pathway might also facilitate encapsulated GBS interaction with caveolin-1, leading to modulation of caveolin-related signalling pathways and activation of specific immune mediators, for instance CCL2. Further studies are needed to elucidate the nature of lipid raft component(s) and signalling pathways involved in GBS interactions with DCs and whether the invasion via lipid rafts versus clathrin-mediated endocytosis has an impact on its intracellular fate and adaptive fitness.

Acknowledgements

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) [grant number 342150-07 to M.S.]. M.S. is the recipient of a Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ) Career Award. P.L. is the recipient of a Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) Doctoral Award. We thank Dr C.E. Rubens, Children's Hospital and Medical Center, University of Washington, Seattle, WA, for kindly providing strain COH-1. We are grateful to Sonia Lacouture (Université de Montréal, Canada) for useful discussions.

References

1. **Edwards MS, Baker CJ.** 2005. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* **41**:839-847.
2. **Koenig JM, Keenan WJ.** 2009. Group B *Streptococcus* and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr Clin North Am* **56**:689-708.
3. **Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL.** 2007. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. *J Clin Microbiol* **45**:2929-2936.
4. **Verani JR, Schrag SJ.** 2010. Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges. *Clin Perinatol* **37**:375-392.
5. **Chaffin DO, Mentele LM, Rubens CE.** 2005. Sialylation of Group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression. *J Bacteriol* **187**:4615-4626.
6. **Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, et al.** 2005. Structural and genetic diversity of Group B *Streptococcus* capsular polysaccharides. *Infect Immun* **73**:3096-3103.
7. **Marques MB, Kasper DL, Pangburn MK, Wessels MR.** 1992. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III Group B streptococci. *Infect Immun* **60**:3986-3993.
8. **Carlin AF, Uchiyama S, Chang YC, Lewis AL, Nizet V, et al.** 2009. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood* **113**:3333-3336.
9. **Doran KS, Nizet V.** 2004. Molecular pathogenesis of neonatal Group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Mol Microbiol* **54**:23-31.
10. **Maisey HC, Doran KS, Nizet V.** 2008. Recent advances in understanding the molecular basis of Group B *Streptococcus* virulence. *Expert Rev Mol Med* **10**:e27.
11. **Lemire P, Houde M, Lecours MP, Fittipaldi N, Segura M.** 2012. Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells. *Microbes Infect* **14**:1064-1076.
12. **Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, et al.** 2009. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* **10**:587-594.
13. **Bonazzi M, Cossart P.** 2006. Bacterial entry into cells: a role for the endocytic machinery. *FEBS Lett* **580**:2962-2967.
14. **Goluszko P, Popov V, Wen J, Jones A, Yallampalli C.** 2008. Group B *Streptococcus* exploits lipid rafts and phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway to invade human endometrial cells. *Am J Obstet Gynecol* **199**:548 e541-549.
15. **Valenti-Weigand P, Benkel P, Rohde M, Chhatwal GS.** 1996. Entry and intracellular survival of Group B streptococci in J774 macrophages. *Infect Immun* **64**:2467-2473.
16. **Alvarez D, Vollmann EH, von Andrian UH.** 2008. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* **29**:325-342.
17. **Manes S, del Real G, Martinez AC.** 2003. Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol* **3**:557-568.
18. **Vieira FS, Correa G, Einicker-Lamas M, Coutinho-Silva R.** 2010. Host-cell lipid rafts: a safe door for micro-organisms? *Biol Cell* **102**:391-407.
19. **Segura MA, Cleroux P, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* and Group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**:189-195.

20. **Lecours MP, Fittipaldi N, Takamatsu D, Okura M, Segura M, et al.** 2012. Sialylation of *Streptococcus suis* serotype 2 is essential for capsule expression but is not responsible for the main capsular epitope. *Microbes Infect* **14**:941-950.
21. **Segura M, Su Z, Piccirillo C, Stevenson MM.** 2007. Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression. *Eur J Immunol* **37**:1887-1904.
22. **Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, et al.** 2011. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis* **204**:919-929.
23. **Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, et al.** 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* **223**:77-92.
24. **MacDonald AS, Straw AD, Bauman B, Pearce EJ.** 2001. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. *J Immunol* **167**:1982-1988.
25. **van den Berg TK, Kraal G.** 2005. A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. *Trends Immunol* **26**:506-509.
26. **Doherty GJ, McMahon HT.** 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* **78**:857-902.
27. **Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, et al.** 2006. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* **10**:839-850.
28. **Kirchhausen T, Macia E, Pelish HE.** 2008. Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Methods Enzymol* **438**:77-93.
29. **Pizarro-Cerda J, Bonazzi M, Cossart P.** 2010. Clathrin-mediated endocytosis: what works for small, also works for big. *Bioessays* **32**:496-504.
30. **Veiga E, Cossart P.** 2006. The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization. *Trends Cell Biol* **16**:499-504.
31. **Gratz N, Hartweger H, Matt U, Kratochvill F, Janos M, et al.** 2011. Type I interferon production induced by *Streptococcus pyogenes*-derived nucleic acids is required for host protection. *PLoS Pathog* **7**:e1001345.
32. **Duncan MJ, Shin JS, Abraham SN.** 2002. Microbial entry through caveolae: variations on a theme. *Cell Microbiol* **4**:783-791.
33. **Wang M, Hajishengallis G.** 2008. Lipid raft-dependent uptake, signalling and intracellular fate of *Porphyromonas gingivalis* in mouse macrophages. *Cell Microbiol* **10**:2029-2042.
34. **Seveau S, Bierne H, Giroux S, Prevost MC, Cossart P.** 2004. Role of lipid rafts in E-cadherin-- and HGF-R/Met--mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *J Cell Biol* **166**:743-753.
35. **Lafont F, van der Goot FG.** 2005. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol* **7**:613-620.
36. **Tateno H, Li H, Schur MJ, Bovin N, Crocker PR, et al.** 2007. Distinct endocytic mechanisms of CD22 (Siglec-2) and Siglec-F reflect roles in cell signaling and innate immunity. *Mol Cell Biol* **27**:5699-5710.
37. **Antal JM, Cunningham JV, Goodrum KJ.** 1992. Opsonin-independent phagocytosis of Group B streptococci: role of complement receptor type three. *Infect Immun* **60**:1114-1121.
38. **Nakayama H, Yoshizaki F, Prinetti A, Sonnino S, Mauri L, et al.** 2008. Lyn-coupled LacCer-enriched lipid rafts are required for CD11b/CD18-mediated neutrophil phagocytosis of nonopsonized microorganisms. *J Leukoc Biol* **83**:728-741.
39. **Liu P, Rudick M, Anderson RG.** 2002. Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem* **277**:41295-41298.

40. **Rohde M, Muller E, Chhatwal GS, Talay SR.** 2003. Host cell caveolae act as an entry-port for Group A streptococci. *Cell Microbiol* **5**:323-342.
41. **Almeida RA, Dunlap JR, Oliver SP.** 2010. Binding of Host Factors Influences Internalization and Intracellular Trafficking of *Streptococcus uberis* in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Vet Med Int* **2010**:319192.
42. **Gadjeva M, Paradis-Bleau C, Priebe GP, Fichorova R, Pier GB.** 2010. Caveolin-1 modifies the immunity to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol* **184**:296-302.
43. **Okazaki K, Kondo M, Kato M, Nishida A, Takahashi H, et al.** 2008. Temporal alterations in concentrations of sera cytokines/chemokines in sepsis due to Group B *Streptococcus* infection in a neonate. *Jpn J Infect Dis* **61**:382-385.
44. **Segura M, Vanier G, Al-Numani D, Lacouture S, Olivier M, et al.** 2006. Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a whole-blood culture system. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**:92-106.
45. **Graveline R, Segura M, Radzioch D, Gottschalk M.** 2007. TLR2-dependent recognition of *Streptococcus suis* is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness. *Int Immunol* **19**:375-389.
46. **Medina FA, de Almeida CJ, Dew E, Li J, Bonuccelli G, et al.** 2006. Caveolin-1-deficient mice show defects in innate immunity and inflammatory immune response during *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection. *Infect Immun* **74**:6665-6674.
47. **Lei MG, Morrison DC.** 2000. Differential expression of caveolin-1 in lipopolysaccharide-activated murine macrophages. *Infect Immun* **68**:5084-5089.
48. **Lei MG, Tan X, Qureshi N, Morrison DC.** 2005. Regulation of cellular caveolin-1 protein expression in murine macrophages by microbial products. *Infect Immun* **73**:8136-8143.
49. **Walton KA, Cole AL, Yeh M, Subbanagounder G, Krutzik SR, et al.** 2003. Specific phospholipid oxidation products inhibit ligand activation of toll-like receptors 4 and 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**:1197-1203.
50. **von Delwig A, Bailey E, Gibbs DM, Robinson JH.** 2002. The route of bacterial uptake by macrophages influences the repertoire of epitopes presented to CD4 T cells. *Eur J Immunol* **32**:3714-3719.
51. **Burgdorf S, Kautz A, Bohnert V, Knolle PA, Kurts C.** 2007. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* **316**:612-626.

ARTICLE III

"The NOD2 receptor does not play a major role in the pathogenesis of Group B *Streptococcus* in mice"

Paul Lemire, Cynthia Calzas and Mariela Segura.

Publié dans: *Microb Pathog.* **2013** Dec;65:41-47.

DOI: 10.1016/j.micpath.2013.09.006.

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

Je suis le premier auteur de l'article. J'ai participé activement au design expérimental, aux expériences, à l'analyse des résultats et à l'écriture de l'article.

The NOD2 receptor does not play a major role in the pathogenesis of Group B *Streptococcus* in mice

Paul Lemire, Cynthia Calzas and Mariela Segura*.

Laboratory of Immunology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,
St-Hyacinthe, Québec, Canada

Running title: GBS interactions with NOD2 receptor

Keywords: Group B *Streptococcus*; Pathogenesis; NOD2; Inflammatory cytokines

* Corresponding author. Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada. Tel.: +1 450 773 8521, ext. 0080; fax: +1 450 778 8108.

Abstract

Group B *Streptococcus* (GBS) capsular type III is an important agent of life-threatening invasive infections. It has been previously shown that encapsulated GBS is easily internalized by dendritic cells (DCs) and this internalization has an impact on cytokine production. The intracellular receptors or pathways underlying this response are not well understood. In this work, we investigated the role of NOD2 in the pathogenesis of GBS using a mouse model of infection. NOD2^{-/-} mice showed similar levels of survival and bacteremia than control mice. Interestingly, *ex vivo* analysis of total spleen cells from infected animals showed that the absence of NOD2 results in reduced production of inflammatory cytokines. However this abridged inflammatory response does not seem to improve mouse survival. In conclusion, we demonstrated that NOD2 is not a crucial receptor to fight GBS infection and only partially contributes to the inflammatory response.

Abbreviations

CFU	Colony-forming unit	NLR	nod-like receptor
CPS	capsular polysaccharide	NLRP3	NLR family pyrin domain-containing protein 3
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand	NOD	nucleotide-binding oligomerization domain-containing
DC	dendritic cells	PE	phycoerythrin
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	PGN	peptidoglycan
FACS	fluorescence-activated cell sorting	Th	T helper
FITC	fluorescein isothiocyanate	TLR	Toll-like receptor
GBS	Group B <i>Streptococcus</i>	TNF	tumor necrosis factor
IFN	interferon	WT	wild-type
IL	interleukin		

Introduction

Group B *Streptococcus* (GBS) or *Streptococcus agalactiae* is the main cause of life-threatening invasive bacterial infections in pregnant women and newborns in North America and Western Europe (1). Clinical manifestations of GBS infection are mainly associated with pneumonia, septicemia, and meningitis. GBS is also increasingly associated with invasive disease in nonpregnant adults, especially among the elderly and individuals with underlying chronic illnesses (2). Like many pathogenic bacteria, clinical isolates of GBS are covered by a capsular polysaccharide (CPS), recognized as the most important factor for bacterial survival within the host. Among ten GBS capsular types that have so far been characterized (1, 2), capsular type III GBS is the most common type in GBS meningitis (1). In a recent work, we showed that mouse-derived dendritic cells (DCs) efficiently internalize encapsulated GBS, but the presence of CPS confers to GBS and intracellular survival advantage compared with a non-encapsulated mutant (3). Likewise, Mancuso *et al.* (4) found GBS antigens in two distinct DC intracellular compartments: DNA⁺ late endosomes/phagosomes and DNA⁻ phagolysosomes containing partially digested GBS material. These observations suggest that DCs possess a high intracellular activity in response to GBS and, thus, it could be assumed that intracellular recognition of GBS is important in the immune response against this pathogen.

The innate immune system has evolved an arsenal of mechanisms to sense and destroy pathogenic bacteria (5). Innate immune response depends on pattern recognition receptors (PRRs) for detection of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). These receptors include Toll-like receptors (TLRs), RIG-I-like receptors and Nod-like receptors (NLRs) family of proteins (6). Most TLRs are transmembrane proteins for sensing extracellular pathogens whereas NLRs sense PAMPs in the cytosolic compartment. In particular, NLRs consist of more than 20 family members including nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 or 2 (NOD1, NOD2) and NLR family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) receptors (6). NOD1 and NOD2 are known to sense molecules produced during the synthesis and/or degradation of bacterial peptidoglycan (PGN), leading to the activation of transcription factor nuclear factor κ B (NF- κ B) and the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (7). Particularly, NOD2 is expressed mainly in the myeloid cells such as DCs and macrophages (8, 9) and recognize muramyl dipeptide (MDP) (8), a PGN constituent of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Several *in vitro* or *in vivo* studies demonstrated

that NOD2 is an important mediator of host defense against a variety of pathogens, including intracellular bacteria like *Listeria monocytogenes* (10), *Mycobacterium tuberculosis* (11-13) and *Legionella pneumophila* (14). NOD2 has also been reported to modulate the immune response to extracellular bacteria, such as *Streptococcus pneumoniae* (15-17), *Streptococcus pyogenes* (18), *Streptococcus suis* (19, 20) and *Staphylococcus aureus* (21-25).

Recently, Costa *et al.* reported that activation of the inflammasome, an inflammatory signaling complex, by GBS type III is involved in host defense against this pathogen and mediates *in vitro* production of interleukin-1 beta (IL-1 β) and IL-18, but not of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) by DCs. Activation of the NLRP3 inflammasome required GBS expression of β -hemolysin, an important virulence factor (26). In previous studies, we demonstrated that GBS internalization by DCs is largely required for modulation of IL-12, IL-10 and C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) pathways (3). We hypothesized that, besides NLRP3, other intracellular receptors sense GBS and influence the immune response and/or bacterial clearance. *In vitro* studies performed so far failed to demonstrate a clear role of NOD in GBS interactions with macrophages (27, 28). Thus, to clarify the impact of NOD2 in the pathogenesis of GBS infection, we performed *in vivo* studies using NOD2^{-/-} mice.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

In this study, we used strain COH-1, a highly encapsulated type III GBS isolate, extensively described in previous work (3, 4, 36, 37). This strain was kindly provided by Dr. C.E. Rubens, Children's Hospital and Medical Center, University of Washington, Seattle, WA. GBS organisms were grown in Todd–Hewitt Broth (THB) or agar (THA) (Becton Dickinson, Mississauga, Ontario, Canada) or on sheep blood agar plates at 37°C for 18 h. Isolated GBS colonies were inoculated in THB, incubated for 8 h at 37°C with shaking. Working cultures for *in vivo* infection were prepared by transferring 10 μ l of 1/1000 dilutions of 8 h-cultures into 30 ml of THB which was incubated for 12 h at 37°C with agitation. Bacteria were washed and resuspended in 20 ml of THB to obtain an OD_{600 nm} value of 0.5-0.6, which corresponded to 2×10^7 CFU/ml. The number of CFU/ml in the final suspension

used for mouse infection was determined by plating samples onto THA using an Autoplate 4000 Automated Spiral Plater (Spiral Biotech, Norwood, MA).

Mouse strains

B6.129S1-*Nod2*^{tm1Flv}/J mice possessing a nucleotide-binding oligomerization domain targeted mutation (referred here as NOD2^{-/-}) and respective control C57BL/6J WT mice were used (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). All experiments involving mice were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the Animal Welfare Committee of University of Montreal.

Experimental infections

Female, 6-week-old, NOD2^{-/-} or respective control WT mice (Jackson Laboratories) were acclimatized to standard laboratory conditions of a 12-h-light/12-h-dark cycle with free access to rodent chow and water. On the day of the experiment, a 0.5 ml volume of either the bacterial suspension (10⁶ CFU or 10⁷ CFU) or the vehicle solution (sterile THB) was administered by intraperitoneal (i.p.) injection. Three independent preliminary trials were performed to establish the optimal bacterial doses and time points (data not shown). A total of 8 mice per mouse strain and dose were closely monitored daily to record mortality and clinical signs of disease, such as depression, rough appearance of hair coat, and swollen eyes. Mice exhibiting extreme lethargy were considered moribund and were humanely euthanized. Blood samples were collected from the tail at 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 24 h and every 24-48 h until 7 days post-infection, and plated onto blood agar plates. Blood agar plates were incubated overnight at 37 °C. Colonies were counted as described above and expressed as CFU/ml of blood.

Ex-vivo cytokine production by total spleen cells

To measure ongoing cytokine production in the spleen, mice were euthanized at 8 h post-infection. Spleens from normal and infected (10⁷ CFU) mice were removed aseptically. Single-cell suspensions were prepared in of RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovin serum, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine and 50 µM

2-mercaptoethanol. All reagents were from Gibco (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Red blood cells were lysed and the cell suspensions were filtered through a sterile mesh. The viability of the cells was determined by trypan blue (Invitrogen) exclusion and was always >95%. Aliquots of 1-ml cell suspensions at a concentration of 5×10^6 cells/ml were cultured in triplicate in 48-well tissue culture plates in complete medium. After 4 h of incubation, the bacteriostatic agent chloramphenicol (12 µg/ml; Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) was added to the culture to prevent cell toxicity as previously reported (3). The above described final culture conditions for *ex vivo* analysis were selected based on multiple pre-trials using different post-infection times (6 h and 12 h) combined with different times of chloramphenicol addition (data not shown). The cultures were incubated for 24 h to 72 h at 37°C in a humidified CO₂ incubator. Supernatants were collected and stored at -20°C until assayed for cytokine levels. In selected experiments, cells were harvested at 48 h of incubation and analyzed by FACS (see below). In addition to spleens, blood was collected by cardiac puncture from infected and control mice at 8 h post-infection to measure cytokine levels in serum.

Cytokine quantification by ELISA

Levels of IL-6, TNF-α, CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) and interferon-gamma (IFN-γ) in cell culture supernatants and/or serum were measured by sandwich ELISA using pair-matched antibodies from R&D Systems (Minneapolis, MN), according to the manufacturer's recommendations. Twofold dilutions of recombinant mouse cytokines were used to generate standard curves. Sample dilutions giving OD readings in the linear portion of the appropriate standard curve were used to quantify the levels of each cytokine.

Ex vivo FACS analysis of total splenocytes

For multi-parametric FACS of total splenocytes, 10^6 cells were washed and treated for 15 min on ice with FcR-blocking reagent (FcγIII/II R_c Ab, BD PharMingen, BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada) in sorting buffer (PBS-1% heat-inactivated fetal bovine serum). Blocked cells were then incubated with PE-conjugated anti-CD19 (clone 1D3), FITC-conjugated anti-CD3 (clone 17A2), and PE-conjugated anti-mouse CD69 mAb (clone H1.2F3) for 30 min on ice. Anti-CD19 and anti-CD69 were from BD PharMingen and anti-CD3 was from BioLegend (San Diego, CA). FACS was performed using a FACSCanto

II instrument (BD Biosciences). Fifty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using FACSDiva Version 6.1.3 software.

Statistical analysis

Data are presented as survival curves using the Kaplan-Meier method, mean \pm SEM or geometric mean with 95% confidence interval where appropriate. Prism v.5 (Graphpad) was used for data analysis. Log-rank (Mantel-Cox) tests were used to compare the survival curves of the different studied groups. An independent Student *t*-test was performed to find statistical differences between groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results and discussion

NOD2 does not contribute to host defense against GBS in adult mice

NOD2 is known to be involved in host recognition of bacteria, although its role in the host response to Group B *Streptococcus* infection has not been fully described. The primary function of NOD2 is to serve as pattern recognition receptors for bacteria and/or their products (8). Several hypotheses are possible about the role of NOD2 in bacterial pathogenesis. The first hypothesis is that bacterial recognition by NOD2 leads a protective response and allows the host immune system to fight infection. Indeed, it was reported that NOD2^{-/-} mice were significantly more susceptible to *S. aureus* infection and had higher bacterial tissue burden than control mice (21). To explore if NOD2 also plays a protective role in the pathogenesis of GBS type III disease, we infected wild-type (WT) C57BL/6 or NOD2^{-/-} mice with a sub-lethal bacterial dose (10^6 CFU). Mice were monitored every 4 h for clinical signs and mortality up to 14 days post-infection. In addition, bacterial burden was measured in blood samples at different times post-infection. All WT mice survived the infection and presented low bacterial load in the blood (10^4 - 10^5 CFU) during the first hours post-infection (Fig. 1A and B). Bacterial load remained stable at 8 h post-infection and started to decrease at 24 h post-infection (data not shown). No significant differences in clinical signs, survival levels or blood bacterial burdens were observed between sub-lethally infected NOD2^{-/-} mice and WT mice (Fig. 1), suggesting that NOD2 is not playing a major in role in host protection against GBS infection in adult mice.

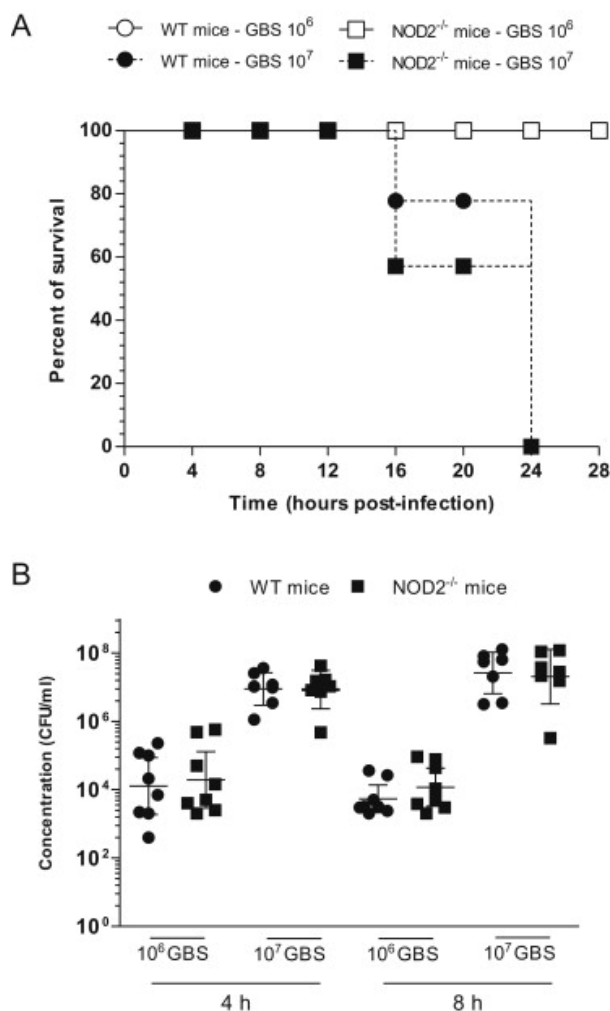


Fig. 1. Absence of NOD2 receptor does not alter mouse susceptibility to GBS infection.

(A) Survival curves of wild-type (WT) C57BL/6 and NOD2^{-/-} mice intraperitoneally-infected with 1×10^6 or 1×10^7 CFU of GBS type III strain COH-1 ($n = 8$). **(B)** Blood bacteremia of mice infected as described above. Blood samples were collected from the tail at 4 h and 8 h post-infection, and plated onto blood agar plates. Colonies were counted and data expressed as CFU/ml of blood. Data are displayed as individual mouse values, an geometric means with 95% confidence interval are also indicated.

A second hypothesis is that, at high bacterial doses, NOD2 contributes to an exacerbated inflammatory response and thus worsen disease progression. A previous study reported that NOD2 mRNA expression was up-regulated after pneumococcal infection and contribute to the recognition and establishment of *S. pneumoniae* infection (16). Pre-trial studies indicated that at a dose of 10^7 CFU, GBS causes severe clinical signs associated with septicemia and/or septic shock, such as depression, swollen eyes, rough hair coat, weakness and high bacterial load in blood during the first 24 h post-infection (data not shown). Thus, we used this bacterial infectious dose to evaluate the contribution of NOD2 to the development of immuno-pathology. We observed 100% of mortality in infected WT mice after 24 h post-infection. Mice presented extremely high levels of bacteremia (10^8 CFU) as early as 4 h post-infection (Fig. 1A and B). Similar results were obtained with 10^7 CFU-

infected NOD2^{-/-} mice and the Kaplan-Meier survival curves were non-significantly different ($P > 0.05$).

Based on these findings, and independently of the bacterial dose, NOD2 does not seem to have an important role in the pathogenesis of GBS disease in an adult mouse model of infection. We cannot, however, rule out the possibility that other compensatory pathways might also be involved. For instance, Costa *et al.* reported a role of NLRP3 in the recognition of GBS type III *in vitro*. In addition, adult mice lacking NLRP3 were more susceptible to infection by a GBS type Ib strain, suggesting involvement of NLRP3 in anti-GBS defense (26). It remains to evaluate *in vivo* whether NLRP3 plays a role in the context of GBS type III infection. In addition, the role of NOD2 in a neonate mouse model of GBS infection warrants further studies.

NOD2 contributes to cytokine and chemokine production during GBS infection

In aforementioned experiments, we demonstrated that NOD2 does not seem to play a major role in modulating bacterial clearance and does not influence mouse survival. Cytokines and chemokines are known to be important mediators of early immune responses. Thus, to give more insight into the observed phenotype of GBS-infected NOD2^{-/-} mice, we measured expression levels of several cytokines and chemokines following GBS infection. To this aim, we infected NOD2^{-/-} mice and control WT mice with 10⁷ CFU of GBS type III for 8 h. Total spleen cells were harvested and analyzed *ex vivo*. Production of cytokines was observed at 24 h of *ex vivo* incubation (data not shown) reaching maximal levels between 48 h and 72 h. The only exception was IFN- γ , as its production was optimal at 72 h post-incubation (Fig. 2). GBS-infected NOD2^{-/-} mice exhibited reduced levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α and of the chemokine CXCL9 and CXCL10 compared to GBS-infected WT mice. Reduced levels of the T helper (Th) 1 cytokine IFN- γ were also observed (Fig. 2). To evaluate the role of NOD2 in GBS induction of circulating cytokines, serum levels of IL-6, TNF- α , CXCL9 and CXCL10 were measured at 8 h post-infection. Fig. 3 shows diminished levels of circulating cytokines in GBS-infected NOD2^{-/-} mice that in WT infected counterparts, confirming results obtained with total spleen cells.

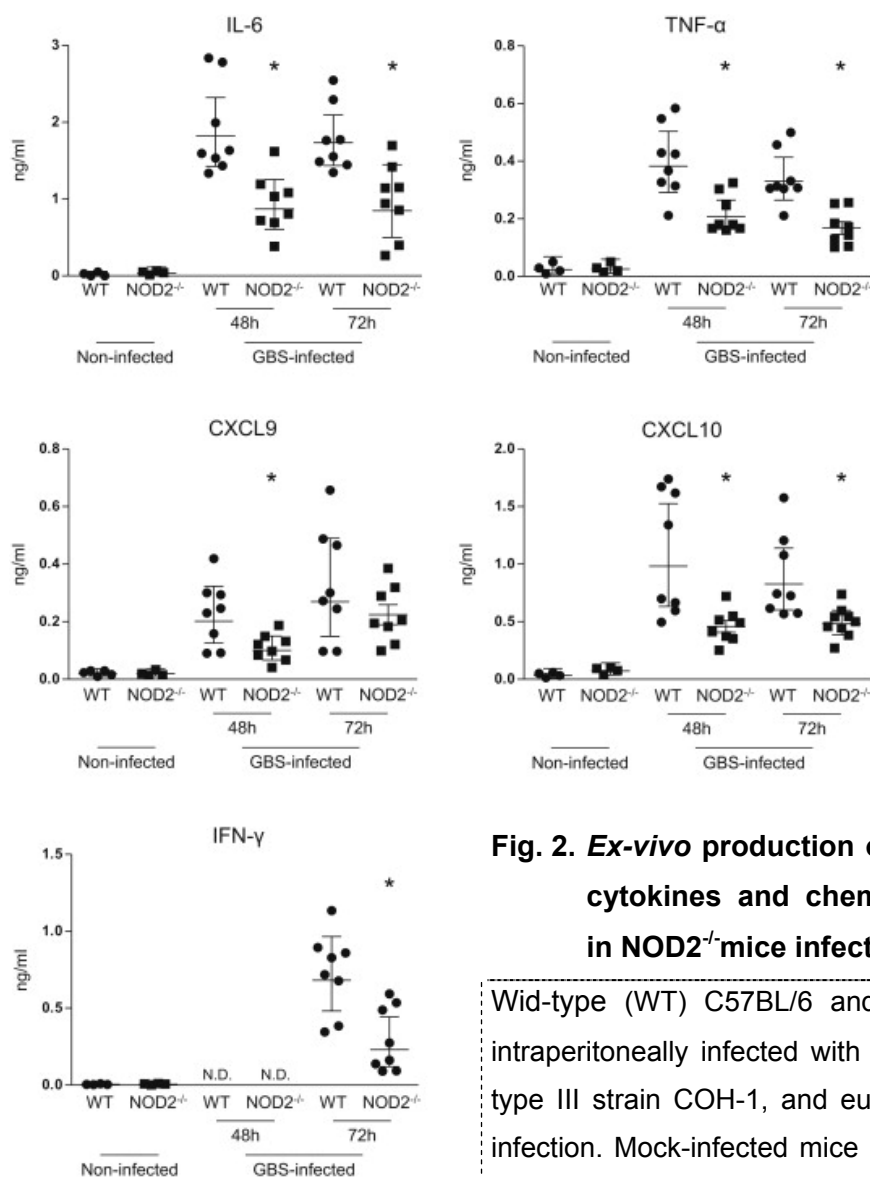


Fig. 2. Ex-vivo production of pro-inflammatory cytokines and chemokines is reduced in NOD2^{-/-} mice infected with GBS.

Wild-type (WT) C57BL/6 and NOD2^{-/-} mice were intraperitoneally infected with 1×10^7 CFU of GBS type III strain COH-1, and euthanized at 8 h post-infection. Mock-infected mice (vehicle solution only) were used as non-infected controls. Spleen cells

were harvested, cultured *ex vivo* and production of IL-6, TNF-α, CXCL9 and CXCL10 in culture supernatants was measured by ELISA after 48 h and 72 h of incubation. IFN-γ levels were measured after 72 h of incubation. Cells from non-infected mice served as negative control (no differences in control cytokine levels were observed between 48 h and 72 h; the latter time point is shown in the figure). Data are displayed as individual mouse values (n = 8) from 2 independent experiments (using 4 mice per group, per experiment). Geometric means with 95% confidence interval are also indicated. * $P < 0.05$ indicates statistically significant differences between WT infected-mice and NOD2^{-/-} infected-mice.

The NOD2 receptor was reported to be implicated in elevated levels of inflammatory mediators, astrogliosis and demyelination, following *in vivo* administration of *S. pneumoniae* (17). The role of NOD2 during *S. aureus* infection is controversial. Kapetanovic *et al.* demonstrated that NOD2 is not a crucial receptor to fight *S. aureus*-induced pneumonia, but that it contributes to the inflammatory response in the lungs. In fact, the absence of NOD2 led to a lesser inflammation and was finally beneficial for the animal recovery (24). In contrast, another study showed that NOD2^{-/-} mice are more susceptible to *S. aureus* infection and that NOD2 have a critical role in regulating the immune response. Increased susceptibility was due in part to defective neutrophil phagocytosis, elevated serum levels of Th1 cytokines, and a higher bacterial tissue burden (21). In our GBS mouse infection model, serum and *ex vivo* cytokine profiles do not correlate with mouse survival, suggesting that NOD2 receptor is not crucial in regulating the inflammatory response during the course of the infection or the observed reduced levels are not sufficient to alter the immunopathological outcome. Finally, we cannot rule out the involvement of other compensatory receptors, such as surface expressed TLRs and/or intracellular located TLRs (29, 30). For example, the release of IL-23 by *S. suis*-stimulated dendritic cells was reported to involve complex synergies between TLR2, NOD2 and other unknown TLRs (19).

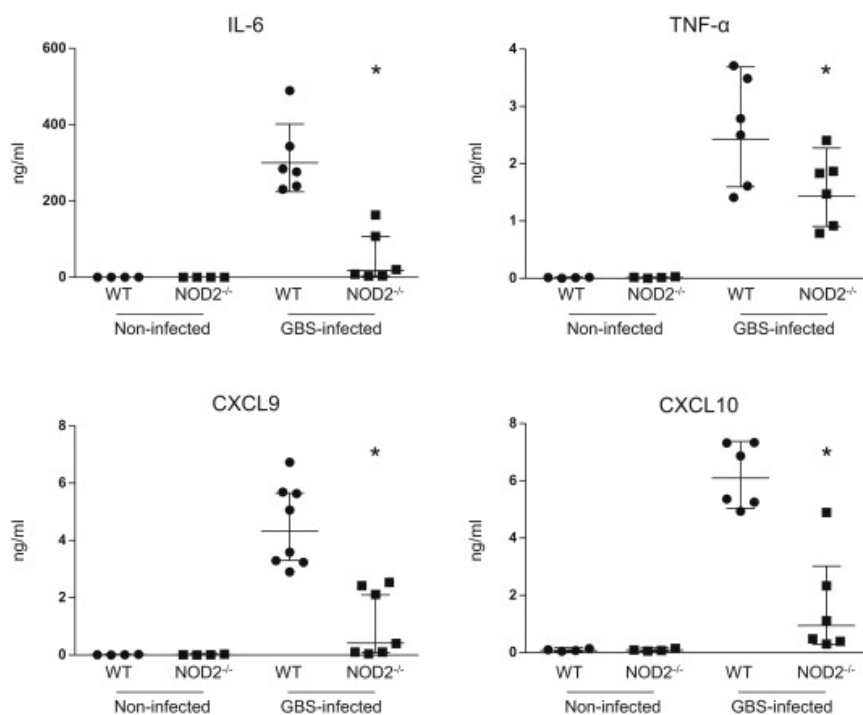


Fig. 3. Serum pro-inflammatory cytokine production is reduced in NOD2^{-/-} mice infected with GBS.

Wild-type (WT) C57BL/6 and NOD2^{-/-} mice were intraperitoneally infected with 1×10^7 CFU of GBS type III strain COH-1, and euthanized at 8 h post-infection. Mock-infected mice (vehicle solution only) were used as non-infected controls. Serum was collected and production of IL-6, TNF-α, CXCL9 and CXCL10 measured by ELISA. Data are displayed as individual mouse

values ($n = 8$) from 2 independent experiments (using 4 mice per group, per experiment). Geometric means with 95% confidence interval are also indicated. * $P < 0.05$ indicates statistically significant differences between WT infected-mice and $NOD2^{-/-}$ infected-mice. N.D. not determined.

Role of NOD2 in the regulation of CD69 expression by cells of the adaptive immune system

The impaired cytokine secretion in infected $NOD2$ -deficient mice may suggest a consequent role of $NOD2$ in adaptive immune response to GBS. However, few studies have examined the contribution of $NOD2$ to the adaptive immune response (31, 32). To start dissecting a potential role of $NOD2$ in this response, we evaluated expression levels of the T and B cell activation marker CD69 (33). CD69 is a type II C-type lectin involved in

lymphocyte migration and cytokine secretion. CD69 expression represents one of the earliest available indicators of leukocyte activation and its rapid induction occurs through transcriptional activation. Multi-parametric FACS analyses of *ex vivo* total splenocytes showed no major differences in CD69 expression levels (either at the % or mean fluorescence intensity levels) between WT T and B cells and $NOD2^{-/-}$ cells during GBS type III infection (Fig. 4). Further studies would be required to measure the impact of $NOD2$ in the development of adaptive immunity, and more importantly on the generation of anti-GBS specific antibodies.

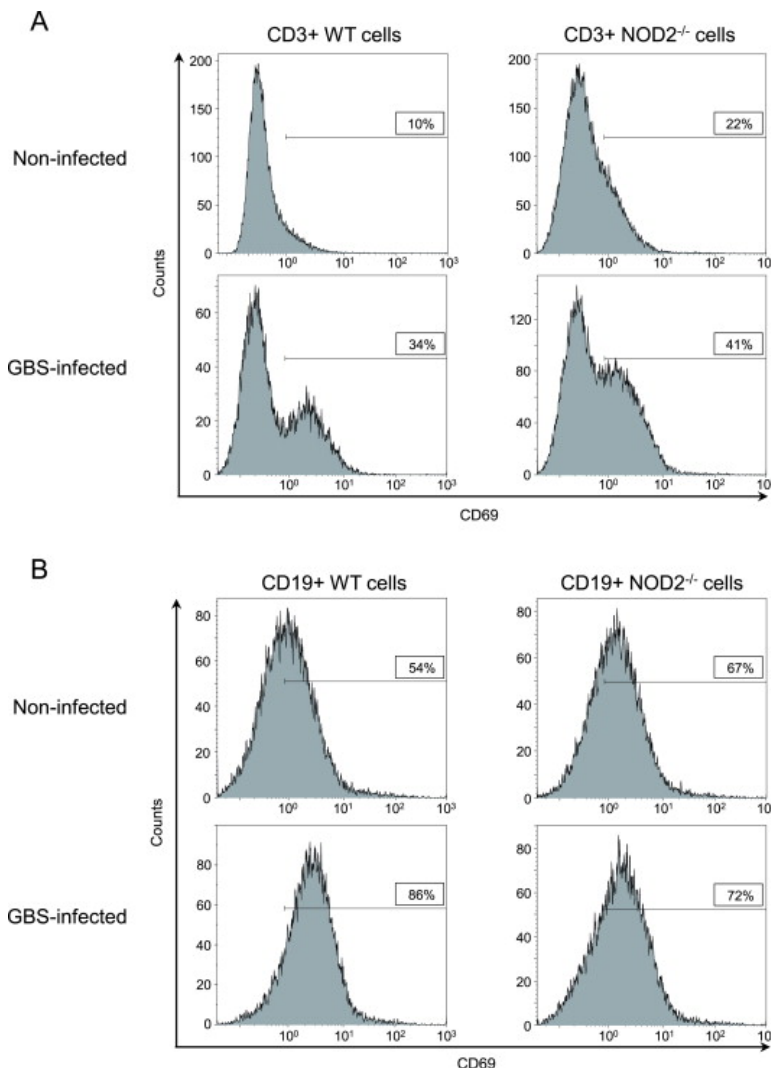


Figure 4. CD69 expression by T and B cells is not significantly altered in GBS-infected NOD2^{-/-} mice.

Wild-type (WT) C57BL/6 and NOD2^{-/-} mice were intraperitoneally infected with 1×10^7 CFU of GBS type III strain COH-1, and euthanized at 8 h post-infection. Mock-infected mice (vehicle solution only) were used as non-infected controls. Spleen cells were harvested and cultured for 48 h. Cells were recovered and stained for CD69 in combination with the surface markers CD3 (T cells; **Panel A**) and CD19 (B cells; **Panel B**) for multi-parametric FACS analysis. Representative data from 3 individual mice. Numbers in the boxes indicate the % of CD3+CD69+ cells or CD19+CD69+ cells, respectively.

Conclusion

In our present study we demonstrated that in the case of GBS type III infection, cytokine production is partially attenuated in NOD2^{-/-} mice. However, this reduced inflammatory response does not seem to significantly influence bacterial burden in blood or survival rates under our assays conditions. Altogether, our data and previous *in vitro* studies support the hypothesis that GBS use complex TLR-dependent, NLRP3-dependent, NOD2-dependent in addition to TLR/NOD2-independent pathways to modulate host immune responses (4, 26-28, 34, 35).

Acknowledgements

We are grateful to Sonia Lacouture (Université de Montréal, Canada) for useful discussions and technical help with mouse infections. We would like to thank Tristan Galbas and Jacques Thibodeau (Université de Montréal, Canada) for their contribution to FACS data acquisition and analysis.

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through grant to MS (#342150-07). PL is the recipient of a PhD Award granted by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies.

References

1. **Koenig JM, Keenan WJ.** 2009. Group B *Streptococcus* and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr Clin North Am* **56**:689-708.
2. **Edwards MS, Baker CJ.** 2005. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* **41**:839-847.
3. **Lemire P, Houde M, Lecours MP, Fittipaldi N, Segura M.** 2012. Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells. *Microbes Infect* **12**:1064-1076.
4. **Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, et al.** 2009. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* **10**:587-594.
5. **Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783-801.
6. **Creagh EM, O'Neill LA.** 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* **27**:352-357.
7. **Franchi L, Park JH, Shaw MH, Marina-Garcia N, Chen G, et al.** 2008. Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol* **10**:1-8.
8. **Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nunez G.** 2009. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol* **4**:365-398.
9. **Kanneganti TD, Lamkanfi M, Nunez G.** 2007. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* **27**:549-559.
10. **Anand PK, Tait SW, Lamkanfi M, Amer AO, Nunez G, et al.** 2011. TLR2 and RIP2 pathways mediate autophagy of *Listeria monocytogenes* via extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation. *J Biol Chem* **286**:42981-42991.
11. **Gandotra S, Jang S, Murray PJ, Salgame P, Ehrt S.** 2007. Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2-deficient mice control infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **75**:5127-5134.
12. **Juarez E, Carranza C, Hernandez-Sanchez F, Leon-Contreras JC, Hernandez-Pando R, et al.** 2012. NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Eur J Immunol* **42**:880-889.
13. **Ferwerda G, Girardin SE, Kullberg BJ, Le Bourhis L, de Jong DJ, et al.** 2005. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **1**:279-285.
14. **Berrington WR, Iyer R, Wells RD, Smith KD, Skerrett SJ, et al.** 2010. NOD1 and NOD2 regulation of pulmonary innate immunity to *Legionella pneumophila*. *Eur J Immunol* **40**:3519-3527.
15. **Davis KM, Nakamura S, Weiser JN.** 2011. Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice. *J Clin Invest* **121**:3666-3676.
16. **Opitz B, Puschel A, Schmeck B, Hocke AC, Rosseau S, et al.** 2004. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **279**:36426-36432.
17. **Liu X, Chauhan VS, Young AB, Marriott I.** 2010. NOD2 mediates inflammatory responses of primary murine glia to *Streptococcus pneumoniae*. *Glia* **58**:839-847.
18. **Heinhuis B, Koenders MI, van de Loo FA, van Lent PL, Kim SH, et al.** 2010. IL-32gamma and *Streptococcus pyogenes* cell wall fragments synergise for IL-1-dependent destructive arthritis via upregulation of TLR2 and NOD2. *Ann Rheum Dis* **69**:1866-1872.

19. **Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M.** 2012. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS One* **7**:e44746.
20. **Zheng H, Sun H, Dominguez-Punaro Mde L, Bai X, Ji S, et al.** 2013. Evaluation of the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* sequence type 7 using the infection of BV2 microglial cells. *J Med Microbiol* **62**:360-368.
21. **Deshmukh HS, Hamburger JB, Ahn SH, McCafferty DG, Yang SR, et al.** 2009. Critical role of NOD2 in regulating the immune response to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **77**:1376-1382.
22. **Hruz P, Zinkernagel AS, Jenikova G, Botwin GJ, Hugot JP, et al.** 2009. NOD2 contributes to cutaneous defense against *Staphylococcus aureus* through alpha-toxin-dependent innate immune activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:12873-12878.
23. **Volz T, Nega M, Buschmann J, Kaesler S, Guenova E, et al.** 2010. Natural *Staphylococcus aureus*-derived peptidoglycan fragments activate NOD2 and act as potent costimulators of the innate immune system exclusively in the presence of TLR signals. *FASEB J* **24**:4089-4102.
24. **Kapetanovic R, Jouvion G, Fitting C, Parlato M, Blanchet C, et al.** 2010. Contribution of NOD2 to lung inflammation during *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. *Microbes Infect* **12**:759-767.
25. **Fournier B, Philpott DJ.** 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* **18**:521-540.
26. **Costa A, Gupta R, Signorino G, Malara A, Cardile F, et al.** 2012. Activation of the NLRP3 inflammasome by Group B streptococci. *J Immunol* **188**:1953-1960.
27. **Charrel-Dennis M, Latz E, Halmen KA, Trieu-Cuot P, Fitzgerald KA, et al.** 2008. TLR-independent type I interferon induction in response to an extracellular bacterial pathogen via intracellular recognition of its DNA. *Cell Host Microbe* **4**:543-554.
28. **Bebien M, Hensler ME, Davanture S, Hsu LC, Karin M, et al.** 2012. The Pore-Forming Toxin beta hemolysin/cytolysin Triggers p38 MAPK-Dependent IL-10 Production in Macrophages and Inhibits Innate Immunity. *PLoS Pathog* **8**:e1002812.
29. **Kawai T, Akira S.** 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* **21**:317-337.
30. **Takeuchi O, Akira S.** 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**:805-820.
31. **Lecat A, Piette J, Legrand-Poels S.** 2010. The protein NOD2: an innate receptor more complex than previously assumed. *Biochem Pharmacol* **80**:2021-2031.
32. **Magalhaes JG, Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Travassos LH, et al.** 2008. NOD2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *J Immunol* **181**:7925-7935.
33. **Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR.** 1994. The activation antigen CD69. *Stem Cells* **12**:456-465.
34. **Wennekamp J, Henneke P.** 2008. Induction and termination of inflammatory signaling in Group B streptococcal sepsis. *Immunol Rev* **225**:114-127.
35. **Deshmukh SD, Kremer B, Freudenberg M, Bauer S, Golenbock DT, et al.** 2011. Macrophages recognize streptococci through bacterial single-stranded RNA. *EMBO Rep* **12**:71-76.
36. **Chaffin DO, Mentele LM, Rubens CE.** 2005. Sialylation of Group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression. *J Bacteriol* **187**:4615-4626.

37. **Lemire P, Houde M, Segura M.** 2012. Encapsulated Group B *Streptococcus* modulates dendritic cell functions via lipid rafts and clathrin-mediated endocytosis. *Cell Microbiol* **14**:1707-1719.

ARTICLE IV

"The NOD2 receptor modulates the cytokine response but does not alter the clinical outcome of Group B *Streptococcus*-infected mice"

Paul Lemire and Mariela Segura.

Publié dans: *Receptor Clin Invest.* **2014.** 2: 29-32.

DOI: 10.14800/rci.55.

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

Je suis le premier auteur de l'article. J'ai activement participé à l'écriture de l'article.

The NOD2 receptor modulates the cytokine response but does not alter the clinical outcome of Group B *Streptococcus*-infected mice

Paul Lemire and Mariela Segura*.

Laboratory of Immunology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,
St-Hyacinthe, Québec, Canada

Running title: GBS interactions with NOD2 receptor

Keywords: Group B *Streptococcus*; Pathogenesis; NOD2; Inflammatory cytokines

* Corresponding author. Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada. Tel.: +1 450 773 8521, ext. 0080; fax: +1 450 778 8108.

Abstract

The nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) is an intracellular receptor capable of sensing bacteria-derived muramyl dipeptide. We investigated the role of NOD2 in the pathogenesis of Group B *Streptococcus* (GBS) capsular type III, a crucial agent of life-threatening invasive infections, by using an adult NOD2^{-/-} mouse model of infection. We demonstrated that NOD2 is not a key receptor to fight GBS infection and only partially contributes to the inflammatory response. This Research Highlight discusses the findings of this recent study and the investigators' active research on the involvement of receptors in the interaction between encapsulated bacteria and dendritic cells

Abbreviations

CCL	chemokine ligand
CPS	capsular polysaccharide
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
DC	dendritic cell
GBS	Group B <i>Streptococcus</i>
IL	interleukin
MyD88	myeloid differentiation primary response 88
NLR	nod-like receptor
NLRP3	NLR family pyrin domain-containing protein 3
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain-containing
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
TLR	Toll-like receptor

Main text

The innate immune system has developed an arsenal of mechanisms to detect and eliminate pathogens (1). Innate immune responses rely on pattern recognition receptors (PRRs) for detection of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). These receptors include Toll-like receptors (TLRs), RIG-I-like receptors and NOD-like receptors (NLRs) family of proteins (2). NLRs recognize PAMPs in the cytosolic compartment and comprise more than 20 family members, including nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 or 2 (NOD1, NOD2) and NLR family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) receptors (2). NOD1 and NOD2 recognize bacterial components derived from peptidoglycan (PGN) synthesis and/or degradation, resulting in the activation of transcription factor nuclear factor κ B (NF- κ B) and the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (3). NOD2 is found especially in myeloid cells such as dendritic cells (DCs) and macrophages (4, 5) and senses muramyl dipeptide (MDP) (4, 5) and senses muramyl dipeptide (MDP) (4), a PGN component of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Many *in vitro* or *in vivo* studies established that NOD2 is a relevant mediator of host defense against a wide range of pathogens, including intracellular bacteria like *Listeria monocytogenes* (6, 7), *Mycobacterium tuberculosis* (8-10), *Neisseria gonorrhoeae* (11), *Helicobacter pylori* (12) and *Legionella pneumophila* (13). NOD2 has also been shown to regulate the immune response to extracellular bacteria, such as *Streptococcus pneumoniae* (14-16), *Streptococcus pyogenes* (17), *Streptococcus suis* (18, 19) and *Staphylococcus aureus* (20-25).

Streptococcus agalactiae or Group B *Streptococcus* (GBS) is an important agent of severe invasive infections in pregnant women and newborns worldwide (26). Clinical manifestations of GBS infection are principally related with pneumonia, septicemia, and meningitis. GBS is also associated to invasive disease in nonpregnant adults, particularly among the elderly and individuals with underlying persistent illnesses (27). Similarly to other bacterial pathogens, clinical isolates of GBS are coated with a capsular polysaccharide (CPS), known as the major factor for bacterial survival within the host. Among described GBS capsular types (26, 27), capsular type III is the principal type isolated from GBS meningitis (26). Mancuso *et al.* (28) reported that GBS antigens can be found either in DC early and late phagosomes (containing intact bacteria) or in degradative vacuoles bearing lysosomal markers and containing partially digested GBS material co-localized with TLR7. Thus, it could be accepted that intracellular recognition of GBS is important in the immune response against this pathogen. Recently, Costa *et al.* (29) reported that activation of the

inflammasome, an inflammatory signaling complex, by GBS is implicated in host defense against this pathogen. On the other hand, *in vitro* studies performed to date were unable to prove a clear role of NOD in GBS interactions with macrophages (30, 31).

In our recent study entitled “The NOD2 receptor does not play a major role in the pathogenesis of *Group B Streptococcus* in mice” (32), we used a mouse model of infection to better understand and give a first indication of the importance of NOD2 during GBS infection. We focused on the implication of NOD2 in the innate immune response against GBS during acute infection. Independently of the bacterial dose, similar survival and bacteremia levels were observed in infected NOD2^{-/-} mice compared to control mice. Interestingly, *ex vivo* analysis of total spleen cells or sera from infected animals demonstrated that the absence of NOD2 results in diminished production of inflammatory cytokines. Nevertheless, this reduced inflammatory response does not seem to favor mouse survival. This study demonstrated that NOD2 is not an important receptor to sense GBS during infection and only weakly contributes to the inflammatory response. Further studies are necessary to measure the effect of NOD2 in the development of adaptive immunity, and more especially on the generation of anti-GBS specific antibodies. In this regard, in our recent study we observed that the expression levels of the T and B cell activation marker CD69, known as one of the earliest available indicators of leukocyte activation, were unaltered in NOD2^{-/-} cells during GBS type III infection (32). Compared to the results reported in the study of Costa *et al* (29), we conclude that NOD2 is not as relevant as NLRP3, at least in adult mice. These findings represent an important step in understanding how GBS interact with immune cells and confirm the hypothesis that GBS use complex TLR-dependent (33), NLRP3-dependent (29), NOD2-dependent in addition to TLR/NOD2-independent pathways to modulate host immune responses.

Our research group use GBS and *S. suis* as models for the study of encapsulated bacteria. *S. suis* is an important swine pathogen and an emerging zoonotic threat in humans able to induce septicemia with sudden death, meningitis, endocarditis, pneumonia, and arthritis (34, 35). GBS and *S. suis* share the feature of being the sole Gram-positive bacteria expressing terminal sialic-acid in their CPSs. Our work mainly focuses on the characterization of the interactions between these pathogens and DCs, with a particular interest on the receptors involved in the recognition of GBS or *S. suis* by these cells. Recently, we showed that encapsulated GBS is efficiently internalized by mouse DCs, yet

the presence of CPS confers to GBS and intracellular survival advantage. Likewise, GBS internalization by DCs is largely required for modulation of IL-10, IL-12p70 and CXCL10 pathways (36). The CPS seems to be important for the recognition of GBS via lipid rafts (37). Receptors implicated in encapsulated GBS recognition within DC lipid raft domains are unknown. Sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins (Siglecs) or integrin CD11b/CD18 may be some of potential receptors used by GBS within lipid microdomains (37). Encapsulated GBS interaction with lipid rafts might also facilitate bacterial contact with caveolin-1, leading to modulation of caveolin-related signaling pathways and activation of specific immune mediators, for instance CCL2 (37). We also observed that highly purified GBS CPSs induced significant production of CCL3 by DCs, via partially TLR2- and myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-dependent pathways, and CCL2, via TLR-independent mechanisms (38). A similar pattern was observed with highly purified *S. suis* CPSs. In addition, DCs also recognize whole *S. suis* and become activated mostly through TLR signaling. Particularly, TLR2 is involved in the release of several cytokines and the expression of co-stimulatory molecules by *S. suis*-infected DCs (18). Besides this major pathway, a multimodal recognition involving a combination of different receptors (NOD2 and TLR9 for example) seems essential for DC effective response to *S. suis* (18). Like *S. suis*, production of cytokines by DCs in contact with GBS (at the extracellular interface) was shown to strongly rely on MyD88-dependent signaling pathways, suggesting that DCs recognize GBS and become activated mostly through TLR signaling (Lemire *et al*, unpublished results). Overall, these results demonstrate the implication of various receptors and the complexity of DC adaptive fitness in contact with GBS or *S. suis*.

We are interested in the future to further dissect the impact of certain families of receptors in recognition of GBS or *S. suis*, but also in characterizing the importance of receptors in the interaction of DCs with other immune cells, including T cells and Natural Killer cells.

Acknowledgement

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through grant to MS (#342150-07). PL is the recipient of a PhD Award granted by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies.

References

1. **Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783-801.
2. **Creagh EM, O'Neill LA.** 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* **27**:352-357.
3. **Franchi L, Park JH, Shaw MH, Marina-Garcia N, Chen G, et al.** 2008. Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol* **10**:1-8.
4. **Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nunez G.** 2009. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol* **4**:365-398.
5. **Kanneganti TD, Lamkanfi M, Nunez G.** 2007. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* **27**:549-559.
6. **Anand PK, Tait SW, Lamkanfi M, Amer AO, Nunez G, et al.** 2011. TLR2 and RIP2 pathways mediate autophagy of *Listeria monocytogenes* via extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation. *J Biol Chem* **286**:42981-42991.
7. **Selvanantham T, Escalante NK, Cruz Tleugabulova M, Fieve S, Girardin SE, et al.** 2013. NOD1 and NOD2 enhance TLR-mediated invariant NKT cell activation during bacterial infection. *J Immunol* **191**:5646-5654.
8. **Gandotra S, Jang S, Murray PJ, Salgame P, Ehrt S.** 2007. NOD2-deficient mice control infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **75**:5127-5134.
9. **Juarez E, Carranza C, Hernandez-Sanchez F, Leon-Contreras JC, Hernandez-Pando R, et al.** 2012. NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Eur J Immunol* **42**:880-889.
10. **Ferwerda G, Girardin SE, Kullberg BJ, Le Bourhis L, de Jong DJ, et al.** 2005. NOD2 and TLRs are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **1**:279-285.
11. **Mavrogiorgos N, Mekasha S, Yang Y, Kelliher MA, Ingalls RR.** 2013. Activation of NOD receptors by *Neisseria gonorrhoeae* modulates the innate immune response. *Innate Immun* DOI : **10.1177/1753425913493453**.
12. **Kim DJ, Park JH, Franchi L, Backert S, Nunez G.** 2013. The Cag pathogenicity island and interaction between TLR2/NOD2 and NLRP3 regulate IL-1 β production in *Helicobacter pylori* infected dendritic cells. *Eur J Immunol* **43**:2650-2658.
13. **Berrington WR, Iyer R, Wells RD, Smith KD, Skerrett SJ, et al.** 2010. NOD1 and NOD2 regulation of pulmonary innate immunity to *Legionella pneumophila*. *Eur J Immunol* **40**:3519-3527.
14. **Davis KM, Nakamura S, Weiser JN.** 2011. NOD2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. *J Clin Invest* **121**:3666-3676.
15. **Opitz B, Puschel A, Schmeck B, Hocke AC, Rosseau S, et al.** 2004. NODs are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **279**:36426-36432.
16. **Liu X, Chauhan VS, Young AB, Marriott I.** 2010. NOD2 mediates inflammatory responses of primary murine glia to *Streptococcus pneumoniae*. *Glia* **58**:839-847.
17. **Heinhuis B, Koenders MI, van de Loo FA, van Lent PL, Kim SH, et al.** 2010. IL-32 γ and *Streptococcus pyogenes* cell wall fragments synergise for IL-1-dependent destructive arthritis via upregulation of TLR2 and NOD2. *Ann Rheum Dis* **69**:1866-1872.
18. **Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M.** 2012. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS One* **7**:e44746.

19. **Zheng H, Sun H, Dominguez-Punaro Mde L, Bai X, Ji S, et al.** 2013. Evaluation of the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* sequence type 7 using the infection of BV2 microglial cells. *J Med Microbiol* **62**:360-368.
20. **Deshmukh HS, Hamburger JB, Ahn SH, McCafferty DG, Yang SR, et al.** 2009. Critical role of NOD2 in regulating the immune response to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **77**:1376-1382.
21. **Hruz P, Zinkernagel AS, Jenikova G, Botwin GJ, Hugot JP, et al.** 2009. NOD2 contributes to cutaneous defense against *Staphylococcus aureus* through alpha-toxin-dependent innate immune activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:12873-12878.
22. **Volz T, Nega M, Buschmann J, Kaesler S, Guenova E, et al.** 2010. Natural *Staphylococcus aureus*-derived peptidoglycan fragments activate NOD2 and act as potent costimulators of the innate immune system exclusively in the presence of TLR signals. *FASEB J* **24**:4089-4102.
23. **Kapetanovic R, Jouvion G, Fitting C, Parlato M, Blanchet C, et al.** 2010. Contribution of NOD2 to lung inflammation during *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. *Microbes Infect* **12**:759-767.
24. **Fournier B, Philpott DJ.** 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* **18**:521-540.
25. **Roth SA, Simanski M, Rademacher F, Schroder L, Harder J.** 2013. The Pattern Recognition Receptor NOD2 Mediates *Staphylococcus aureus*-Induced IL-17C Expression in Keratinocytes. *J Invest Dermatol* DOI: **10.1038/jid.2013.313**.
26. **Koenig JM, Keenan WJ.** 2009. Group B *Streptococcus* and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr Clin North Am* **56**:689-708.
27. **Edwards MS, Baker CJ.** 2005. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* **41**:839-847.
28. **Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, et al.** 2009. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* **10**:587-594.
29. **Costa A, Gupta R, Signorino G, Malara A, Cardile F, et al.** 2012. Activation of the NLRP3 inflammasome by Group B *Streptococci*. *J Immunol* **188**:1953-1960.
30. **Bebien M, Hensler ME, Davanture S, Hsu LC, Karin M, et al.** 2012. The pore-forming toxin beta hemolysin/cytolysin triggers p38 MAPK-dependent IL-10 production in macrophages and inhibits innate immunity. *PLoS Pathog* **8**:e1002812.
31. **Charrel-Dennis M, Latz E, Halmen KA, Trieu-Cuot P, Fitzgerald KA, et al.** 2008. TLR-independent type I interferon induction in response to an extracellular bacterial pathogen via intracellular recognition of its DNA. *Cell Host Microbe* **4**:543-554.
32. **Lemire P, Calzas C, Segura M.** 2013. The NOD2 receptor does not play a major role in the pathogenesis of Group B *Streptococcus* in mice. *Microb Pathog* **65**:41-47.
33. **Wennekamp J, Henneke P.** 2008. Induction and termination of inflammatory signaling in Group B streptococcal sepsis. *Immunol Rev* **225**:114-127.
34. **Segura M.** 2009. *Streptococcus suis*: an emerging human threat. *J Infect Dis* **199**:4-6.
35. **Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M.** 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol* **7**:259-279.
36. **Lemire P, Houde M, Lecours MP, Fittipaldi N, Segura M.** 2012. Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells. *Microbes Infect* **14**:1064-1076.

37. **Lemire P, Houde M, Segura M.** 2012. Encapsulated Group B *Streptococcus* modulates dendritic cell functions via lipid rafts and clathrin-mediated endocytosis. *Cell Microbiol* **14**:1707-1719.
38. **Calzas C, Goyette-Desjardins G, Lemire P, Gagnon F, Lachance C, et al.** 2013. Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* capsular polysaccharides induce chemokine production by dendritic cells via TLR2- and MyD88-dependent and -independent pathways. *Infect Immun* **81**:3106-3118.

ARTICLE V**“Implication of TLR- but not of NOD2-signaling pathways in dendritic cell activation by Group B *Streptococcus* serotypes III and V”**

Paul Lemire, David Roy, Nahuel Fittipaldi, Masatoshi Okura, Daisuke Takamatsu, Eugenia Bergman and Mariela Segura.

Publié dans: *PloS One*. **2014**. Dec; 9(12): e113940.

DOI: 10.1371/journal.pone.0113940

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

Je suis le premier auteur de l'article. J'ai participé activement au design expérimental, aux expériences, à l'analyse des résultats et à l'écriture de l'article.

Implication of TLR- but not of NOD2-signaling pathways in dendritic cell activation by Group B *Streptococcus* serotypes III and V

Paul Lemire¹, David Roy¹, Nahuel Fittipaldi^{2,3}, Masatoshi Okura⁴, Daisuke Takamatsu^{4,5}, Eugenia Bergman¹ and Mariela Segura^{1*}.

¹Laboratory of Immunology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada; ²Public Health Ontario, Toronto, Ontario, Canada; ³Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada; ⁴Bacterial and Parasitic Diseases Research Division, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Ibaraki, Japan; ⁵The United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, Gifu, Gifu, Japan

Running title: GBS interactions with TLR and NOD2 in dendritic cells

Keywords: Group B *Streptococcus*; capsular polysaccharide; phagocytosis; cytokines; dendritic cells

* Corresponding author. Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada. Tel.: +1 450 773 8521, ext. 0080; fax: +1 450 778 8108.

Abstract

Group B *Streptococcus* (GBS) is an important agent of life-threatening invasive infection. It has been previously shown that encapsulated type III GBS is easily internalized by dendritic cells (DCs), and that this internalization had an impact on cytokine production. The receptors underlying these processes are poorly characterized. Knowledge on the mechanisms used by type V GBS to activate DCs is minimal. In this work, we investigated the role of Toll-like receptor (TLR)/MyD88 signaling pathway, the particular involvement of TLR2, and that of the intracellular sensing receptor NOD2 in the activation of DCs by types III and V GBS. The role of capsular polysaccharide (CPS, one of the most important GBS virulence factors) in bacterial-DC interactions was evaluated using non-encapsulated mutants. Despite differences in the role of CPS between types III and V GBS in bacterial internalization and intracellular survival, no major differences were observed in their capacity to modulate release of cytokines by DC. For both serotypes, CPS had a minor role in this response. Production of cytokines by DCs was shown to strongly rely on MyD88-dependent signaling pathways, suggesting that DCs recognize GBS and become activated mostly through TLR signaling. Yet, GBS-infected TLR2^{-/-} DCs only showed a partial reduction in the production of IL-6 and CXCL1 compared to control DCs. Surprisingly, CXCL10 release by type III or type V GBS-infected DCs was MyD88-independent. No differences in DC activation were observed between NOD2^{-/-} and control DCs. These results demonstrate the involvement of various receptors and the complexity of the cytokine production pathways activated by GBS upon DC infection.

Abbreviations

APC	antigen-presenting cell	MAPK	mitogen-activated protein kinase
bmDC	bone marrow-derived DC		
CCL	chemokine ligand	MOI	multiplicity of infection
CFU	Colony-forming unit	MyD88	myeloid differentiation primary response 88
CPS	capsular polysaccharide		
CTRL	control	NLR	nod-like receptor
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand	NLRP3	NLR family pyrin domain-containing protein 3
DC	dendritic cell		
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	NOD	nucleotide-binding oligomerization domain-containing
FACS	fluorescence-activated cell sorting		
GBS	Group B <i>Streptococcus</i>	PAMP	pathogen-associated molecular pattern
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor	PE	phycoerythrin
		PGN	peptidoglycan
IFN	interferon	Th	T helper
IL	interleukin	TLR	Toll-like receptor
KO	knock-out mice	TNF	tumor necrosis factor
LDH	lactate deshydrogenase	WT	wild-type

Introduction

Group B *Streptococcus* (GBS) or *Streptococcus agalactiae* is an important cause of severe invasive bacterial infections worldwide (1). Clinical manifestations of GBS infection include pneumonia, septicemia, and meningitis in newborns and infants. GBS diseases also occur in pregnant women, and have been recognized as an emerging cause of life-threatening invasive infections in adults, particularly the elderly and immunocompromised patients (2). Clinical isolates of GBS are covered by a capsular polysaccharide (CPS) recognized as the most important factor for bacterial survival within the host (3). Among ten GBS CPS types that have been characterized (1, 2, 4), type III GBS is the most common type in GBS meningitis (1). A cohort study suggested that the high invasiveness of this serotype may be related, at least in part, to inadequate maternal and infant levels of type III CPS-specific antibodies (5). Type V GBS has long been recognized as a leading cause of invasive disease in adults (2, 6). To date, there are no guidelines for the prevention of adult GBS disease; vaccines in development may hold promise (6). In a cross-sectional study analyzing older adult subjects (7), impaired type V GBS killing was associated with a low concentration of CPS-specific antibodies as well (7, 8).

Different types of leukocytes accomplish dedicated tasks in antigen presentation and killing of pathogens (9). Dendritic cells (DCs) are recognized as the most powerful antigen-presenting cells (APCs) that initiate immune responses against pathogens and are considered an essential link between innate and adaptive immunity. In fact, DCs principal function is to alert the immune system, not to clear invading microorganisms. DCs capture and process antigens, and then undergo a maturation process characterized by the production of cytokines and up-regulation of co-stimulatory molecules. Afterwards, DCs migrate to adjacent lymphoid organs where they activate T cells (10). The interactions between DCs and pathogens can, not only influence the pathogenesis of a disease, but also the magnitude and phenotype of the ensuing adaptive immune response. Recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by DCs is mediated by pattern-recognition receptors (PRRs), including the Toll-like receptor (TLR) and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor (NLR) families (11). Most TLRs are transmembrane proteins for sensing extracellular pathogens whereas NLRs sense PAMPs in the cytosolic compartment. Specially, TLR2 is reported to be specialized for the recognition of lipoproteins by generally forming a heterodimer with TLR1 or TLR6 (12, 13).

NLRs include the two-well characterized NOD1 and NOD2 (14). NOD2 is known to sense molecules produced during the synthesis and/or degradation of bacterial peptidoglycan (PGN) and recognize muramyl dipeptide (15), a PGN constituent of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Interactions between TLRs and NODs with their ligands initiate an intracellular signaling cascade that induces the secretion of several pro-inflammatory cytokines and the expression of co-stimulatory cell surface molecules through the activation of transcription factors, including NF- κ B (13). Signaling occurs through association of TLRs with several adaptor molecules, such as the myeloid differentiation factor 88 (MyD88) (13). MyD88 is utilized by all TLRs with the exception of TLR3 and drives NF- κ B and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation to control inflammatory responses.

In contrast to other Gram-positive bacteria, TLR2 seems to play a minor role in type III GBS interactions with the host (16-23). Nevertheless, among immune cells, few studies explored the role of TLRs on GBS modulation of DC functions. It has been shown that despite the importance of MyD88, TLRs 2, 4 and 9 are not involved in the production of interleukin-1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) by type III GBS-infected DCs (24). However, TLR7 and TLR9 do recognize type III GBS nucleic acids in DC phagolysosomes after partial bacterial degradation, leading to interferon- β secretion (IFN- β) (25). The few *in vitro* studies performed so far failed to demonstrate a clear role of NOD in types Ia and V GBS interactions with macrophages (23, 26). We previously reported that NOD2 is not a crucial receptor to fight type III GBS infection in adult mice but the release of inflammatory cytokines in sera and by total spleen cells from GBS-infected NOD2^{-/-} mice is reduced (27). However, no data are available concerning the role of TLR2 in GBS induction of other cytokines and chemokines, or whether different GBS serotypes interact differently with DCs. Similarly, the role of NOD2 in GBS interactions with DCs is so far unknown. In this study, we used C57BL/6 mouse bone marrow-derived DCs (bmDCs) to investigate their interactions with types III and V GBS and evaluated the capacity of these different GBS serotypes to activate DC. The potential contribution of TLR2, MyD88 adaptor protein and NOD2 in this response was assessed using bmDC generated from knock-out (KO) mice. Finally, as CPS is the most external layer at the surface of the bacteria and thus a key candidate to be involved in bacterial internalization by and interaction with DCs, the role of bacterial CPS in these processes was studied using isogenic non-encapsulated mutants.

Materials and Methods

Ethics Statement

All experiments involving mice were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the Animal Welfare Committee of the Université de Montréal. The protocols and procedures were approved by the Ethics Committee (CÉUA).

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Encapsulated type III GBS strain COH-1 and its isogenic non-encapsulated mutant ($\Delta cpsE$) were described in previous work (25, 28-30). Strain CJB111 (ATCC BAA-23) is a highly encapsulated type V GBS isolate from a neonate with septicemia (31). An isogenic non-encapsulated type V ($\Delta cpsE$) mutant was generated in this study (see below). GBS strains were grown in Todd-Hewitt Broth (THB) or agar (THA) (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) or on sheep blood agar plates at 37 °C for 18 h. *Escherichia coli* strains were cultured in Luria-Bertani broth or agar (Becton Dickinson) at 37 °C for 18 h. When necessary, antibiotics (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) were added to culture media at the following concentrations: kanamycin and spectinomycin at 50 µg/ml for *E. coli*, and spectinomycin at 200 µg/ml for GBS. To perform GBS-bmDCs interaction studies, GBS strains were grown as previously described (28, 29) and diluted in complete cell culture medium prior to the experiments. The number of CFU/ml in the final suspension was determined by plating samples onto THA using an Autoplate 4000 Automated Spiral Plater (Spiral Biotech, Norwood, MA, USA). Levels of CPS production by GBS type III and type V strains were compared by chromatographic purification methods and after purity confirmation by nuclear magnetic resonance as previously described (32). From 8 liters of GBS type III or type V culture (adjusted at O.D. values = 0.8) the average yield of highly pure CPS was of: 59.25 mg \pm 17.5 (n = 4) for type III GBS and of 50.5 mg \pm 9.1 (n = 4) for type V GBS.

Table I. Bacterial strains, plasmids and oligonucleotide primers used in this study

Strains/Plasmids/Primers	General characteristics	Source/Reference
<u><i>Escherichia coli</i></u>		
TOP 10	F- <i>mrcA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M5 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Life Technologies Inc.
<u>Group B <i>Streptococcus</i></u>		
COH-1	Wild-type, highly encapsulated strain isolated from an infant with bacteremia. Serotype III	(30)
Δ <i>cpsE</i>	Non-encapsulated strain derived from strain COH-1. Deletion of the <i>cpsE</i> gene	(28)
CJB111	Wild-type, highly encapsulated strain isolated from a neonate with septicemia. Serotype V	(31)
Δ <i>cpsE</i>	Non-encapsulated strain derived from strain CJB111. Deletion of the <i>cpsE</i> gene	In this work
<u>Plasmids</u>		
pCR2.1	Ap ^r , Km ^r , <i>oriR</i> (f1) MCS <i>oriR</i> (ColE1)	Life Technologies Inc.
pSET4s	Thermosensitive vector for allelic replacement. Replication functions of pG+host3 and pUC19, MCS, <i>lacZ</i> , Sp ^R	(33)
p4 Δ <i>cpsE</i>	pSET4s carrying the construct for <i>cpsE</i> allelic replacement	In this work
<u>Oligonucleotide primers, sequence (5' – 3')</u>		
SAVE-ID1	CGGGTTTATTGTTGGTGCAGG	
SAVE-ID2	TCTTCAAGATAGCCACGACTCC	
SAVE-ID3	GCGACGCCTTAGTTTTAAGCC	
SAVE-ID4	ACGGACGATTCATCATTCCCTC	
SAVE-ID5	TGGTCGTTTCCTTCAGGGAAAG	
SAVE-ID6	GCTCCTGTCCCGAGTAAACTCCACAAGTGGTTGAATCATCGC	
SAVE-ID7	GCGATGATTCAAACAGTTGTGGAGTTTTACTCGGGACAGGAGC	
SAVE-ID8	AATGGTACTGCTACAGCGGC	

Construction of type V GBS non-encapsulated mutant

GBS genomic DNA was extracted by InstaGene Matrix solution (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Minipreparations of recombinant plasmids and transformation of *E. coli* were performed by standard procedures. Restriction enzymes and DNA-modifying enzymes were purchased from TaKaRa Bio (Otsu, Shiga, Japan) and used according to the manufacturers' recommendation. PCR reactions were carried out with iProof proofreading DNA polymerase (BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Oligonucleotide primers were from IDT technology (Coralville, IA, USA). Amplification products were purified with QIAGEN PCR purification kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) and sequenced with an ABI 310 automated DNA sequencer, using the ABI PRISM dye terminator cycle sequencing kit (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada).

The DNA sequence of type V GBS strain CJB111 capsular (*cps*) locus was retrieved from GenBank (Accession numbers AAJQ01000091.1 and AAJQ01000044.1) and used as sequence template for primers design. Precise deletion of the *cpsE* (1304 bp) gene was constructed by using splicing-by-overlap-extension PCR and the primers listed in Table 1. The PCR-generated $\Delta cpsE$ deletion allele was cloned into plasmid pCR2.1 (Invitrogen), extracted with EcoRI and recloned into the thermosensitive shuttle plasmid pSET4s (33) digested with the same enzyme, giving rise to the knockout vector p4 $\Delta cpsE$. Electroporation of GBS with the recombinant plasmid and procedures for isolation of mutants were those described previously (28). Allelic replacement was confirmed by PCR and sequencing analysis. The non-encapsulated ($\Delta cpsE$) phenotype of the mutant was confirmed by absence of reaction in the coagglutination test using rabbit antisera against type V GBS capsular material (Denka Seiken, Campbell, CA, USA), and by transmission electron microscopy using polycationic ferritin labeling as previously described (Fig. 1A) (28). Growth rates were not significantly affected in the mutant strain compared to wild-type (WT) GBS (Fig. 1B).

Generation of bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs)

BmDCs were generated from six to eight week-old female mice originated from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), including control (CTRL) C57BL/6J, MyD88^{-/-} (B6.129P2-Myd88^{tm1Defr}/J), TLR2^{-/-} (B6.129-Tlr2^{tm1Kir}/J) and NOD2^{-/-} (B6.129S1-Nod2^{tm1Flv}/J). BmDCs were produced according to a technique described elsewhere (28, 29). Briefly, after red blood cell lysis, total bone marrow cells (2.5×10^5 cells/ml) were cultured in complete medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 20 µg/ml gentamicin, 100 U/ml penicillin-streptomycin, 2 mM L-glutamine and 50 µM 2-mercaptoethanol. All reagents were from Gibco (Life Technologies Inc.). Complete medium was complemented with 20% GM-CSF from a mouse GM-CSF transfected cell line (Ag8653) as a source of GM-CSF (34). Cells were cultured for 7 days at 37 °C with 5% CO₂. On day 7, clusters were harvested and subcultured overnight to remove adherent cells. Non-adherent cells were collected on day 8 and used as immature bmDCs for the studies. Cell purity was routinely $\geq 88\%$ CD11c^{+high} cells as determined by FACS analysis and as previously reported (28).

Bacterial internalization assays

BmDCs at a concentration of 10^6 cells/ml were infected with 10^6 CFU/ml of WT type V GBS or its non-encapsulated mutant strain (initial MOI:1), and incubated for 0.5 to 3 h at 37 °C with 5% CO₂ (without addition of exogenous complement). MOI and assay conditions were chosen based on previous studies on the kinetics of type III GBS phagocytosis by DCs (28). After incubation, 100 µg/ml of gentamicin and 5 µg/ml of penicillin G (Sigma-Aldrich) were added to kill extracellular bacteria. After 1 h-antibiotic treatment, cells were washed 3 times with PBS, lysed with sterile water and viable intracellular streptococci enumerated by quantitative plating of serial dilutions of the lysates on THA.

For intracellular survival studies, internalization assays were performed as described above, except that after a 60 min initial bacterial-cell contact, gentamicin-penicillin were added and the treatment was lengthened for different times up to 5 h. The results were expressed as CFU/ml of recovered intracellular viable bacteria.

In vitro bmDC stimulation assay

BmDCs were resuspended at 10^6 cells/ml in complete medium and stimulated with different GBS strains (10^6 CFU/ml; initial MOI:1). Conditions used were based on those already published (28). After 2 h of bmDC-GBS infection, the bacteriostatic agent chloramphenicol (CM, 12 μ g/ml, Sigma-Aldrich) was added to the culture to prevent cell toxicity as previously reported (28). After 16 h of incubation, supernatants were collected for cytokine quantification by ELISA. Non-stimulated cells served as negative control. The specific TLR2-ligand PAM(3)CSK(4) (at 0.5 μ g/ml [Invivogen, San Diego, CA, USA]), the TLR4-ligand lipopolysaccharide (ultra-pure LPS, at 1 μ g/ml [Apotech Corporation, Epalinges, Switzerland]), and the specific NOD2-ligand muramyl dipeptide (MDP, at 10

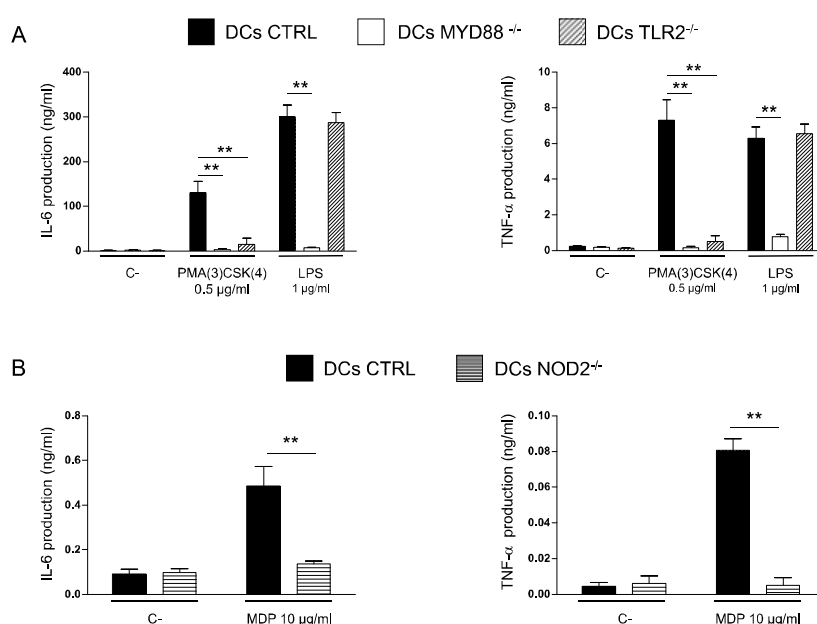


Fig. S1. Cytokine response of knock-out cells using specific TLR-ligands.

Control (CTRL), MyD88^{-/-}, TLR2^{-/-} or NOD2^{-/-} bone marrow-derived dendritic cells (DCs) were stimulated with ultra-pure lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/ml), PAM(3)CSK(4) (0.5 μ g/ml) or muramyl dipeptide (MDP, at 10 μ g/ml). Non-stimulated cells served as negative control (C-) for basal expression levels. Supernatants were harvested at 16 h of incubation and cytokine production quantified by ELISA. Data are expressed as mean \pm SEM (in ng/ml) from four independent experiments. ** $P < 0.01$, indicates statistically significant differences between CTRL and knock-out cells at the same condition.

μ g/ml [Invivogen]) were used as controls (**Fig. S1**). Lactate dehydrogenase (LDH) release measurement assay was used to confirm absence of cytotoxicity in bacterial-bmDC cultures (Promega CytoTox96, Promega Corporation, Madison, WI, USA) (28).

Cytokine quantification by ELISA

Levels of IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-23p19, TNF- α , CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α) CXCL1 (KC) and CXCL10 (IP-10) in cell culture supernatants were measured by sandwich ELISA using pair-matched antibodies from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) or eBioscience (San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. Twofold dilutions of recombinant mouse cytokines were used to generate standard curves. Sample dilutions giving OD readings in the linear portion of the appropriate standard curve were used to quantify the levels of each cytokine.

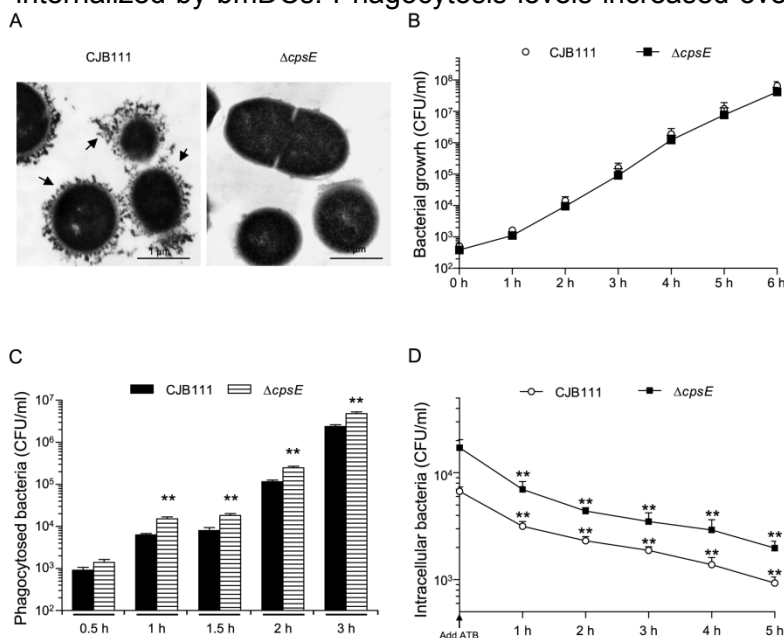
Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed for significance using Student's unpaired *t*-test. A *P* value < 0.05 was used as a threshold for significance. All experiments were repeated at least three times.

Results and discussion

DCs efficiently internalize both the encapsulated and the non-encapsulated type V GBS strains.

We demonstrated previously that encapsulated type III GBS is easily internalized by DCs, but efficiently survives inside these cells for at least 6 h (28). The CPS only slightly and transitorily affects type III GBS internalization at short incubation times (1 h). On the other hand, the type III CPS plays a role in modulating bacterial survival within DCs (28). To date, despite interactions with human epithelial and endothelial cells (35-39), mouse macrophages or human neutrophils (23, 40-42), no data are available on the phagocytosis capacity of bmDCs face to type V GBS or on the importance of the type V CPS in modulating this activity. As shown in Fig. 1C, the encapsulated CJB111 strain was rapidly internalized by bmDCs. Phagocytosis levels increased over time reaching levels as high as



10^7 CFU of total recovered intracellular bacteria at 3 h. Longer incubation times could not be tested, as GBS type V was toxic to bmDCs (by LDH assay, data not shown). After 1 h of incubation, the $\Delta cpsE$ mutant was significantly more internalized than the WT strain and this difference was observed at least until 3 h of incubation ($P < 0.01$).

Fig. 1. Phagocytosis by and intracellular survival within DCs of type V GBS: role of bacterial capsular polysaccharide.

(A) Transmission electron micrographs of GBS strains labeled with polycationic ferritin show GBS wild-type strain CJB111 with a thick capsule (indicated by arrows) whereas no capsular material is observed in $\Delta cpsE$ mutant strain. (B) Growth curves of wild-type GBS strain CJB111 and $\Delta cpsE$ mutant strain. (C) Wild-type type V GBS strain CJB111 or the $\Delta cpsE$ non-encapsulated mutant (10^6 CFU/ml, initial MOI:1) were incubated with C57BL/6J-derived bmDCs

for different time periods. Internalized bacteria were enumerated by quantitative plating after 1 h of antibiotic treatment to kill extracellular bacteria. ** $P < 0.01$, indicates statistically significant differences between the wild-type strain CJB111 and the non-encapsulated mutant, $n = 5$. **(D)** For intracellular survival assays, bmDCs were infected with GBS strains (MOI:1) and phagocytosis was left to proceed for 60 min. Antibiotics (ATB) were then added for 1 h (defined as time 0). This initial antibiotic-treatment was extended up to 5 h and cells lysed to quantify intracellular bacteria by viable plate counting. ** $P < 0.01$, indicates incubation times for which significantly differences in the numbers of recovered intracellular bacteria were observed compared to time 0, $n = 8$. All results are expressed as CFU recovered bacteria per ml (means \pm SEM). It should be noted that initial MOI was the same for all conditions and bacterial growth rate in the culture medium was identical for both strains.

Survival assay (Fig. 1D) showed a slow decrease in WT GBS intracellular survival, which was statistically significant after 1 h of GBS post-internalization ($P < 0.01$), with $\sim 2 \times 10^3$ CFU of remaining live intracellular bacteria at the end of the survival test. Although the non-encapsulated mutant strain was more internalized than the WT strain, the intracellular survival rates remained similar to those of the parental strain.

Compared to type III GBS, type V CPS slightly prevented the internalization of GBS overtime, but does not seem to protect bacteria from intracellular killing. GBS is serologically classified into ten distinct serotypes (Ia, Ib, II-IX) based on antigenic differences in the CPS (3). The structures of the ten CPS types are similar in their constituent monosaccharide compositions and certain structural motifs, yet they differ sufficiently to be antigenically distinct. The polysaccharide repeat unit structures of types III and V are not closely related and may explain the observed differences (3). Variations in the thickness of CPS expressed by the strains used in this study cannot be completely ruled out, albeit CPS yields seem to be similar between the two strains (as aforementioned). Finally, intrinsic differences related to these two particular strains and independent of the serotype might also influence bacterial phagocytosis.

Internalization of GBS is independent of TLR and NOD2 receptor signalling

Albeit controversial, it has previously been reported that TLRs may be involved as receptors for bacterial phagocytosis (43, 44). The absence of TLR2 delayed *Streptococcus*

pneumoniae phagocytosis and killing by neutrophils (45). In contrast, TLRs were shown not to play a significant role in phagocytosis of type III GBS by peritoneal macrophages (20) and *Streptococcus suis* by DCs (46). On the other hand, it has been observed that NOD1- or NOD2-deficient mice have decreased phagocytic abilities (47, 48), in particular in neutrophils. Yet, the influence of NOD receptors on phagocytosis does not seem to be universal (49, 50). So, in this study, GBS internalization by DCs was evaluated by the antibiotic-protection phagocytosis assay using bmDCs from MyD88^{-/-}, TLR2^{-/-} and NOD2^{-/-} mice. As displayed in **Fig. 2**, no significant differences were observed in bmDC capacity to internalize WT GBS strains in the absence of MyD88, TLR2 or NOD2. The difference in phagocytosis levels between WT strains and their respective non-encapsulated mutants remained the same in deficient-bmDCs compared to CTRL cells. Similarly, no differences were observed in the intracellular fate of GBS strains between CTRL and KO cells (data not shown).

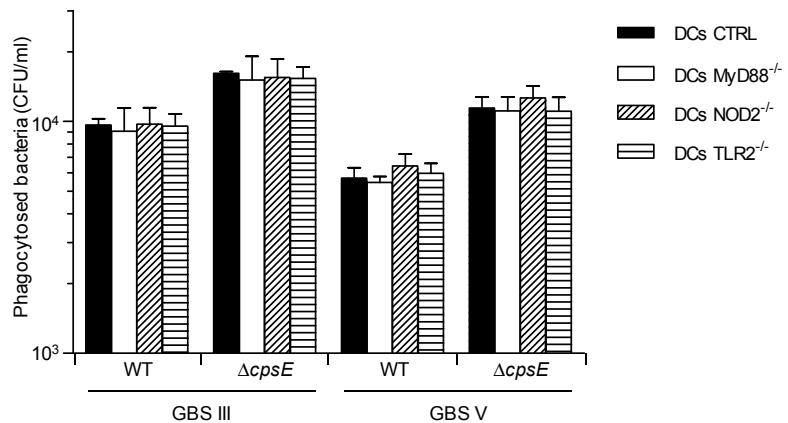


Fig. 2. Effect of MyD88, TLR2 or NOD2 deficiency on the capacity of DCs to internalize GBS.

Control (CTRL), MyD88^{-/-}, TLR2^{-/-} or NOD2^{-/-} bmDCs were incubated for 1 h with GBS wild-type (WT) strains or their respective non-encapsulated ($\Delta cpsE$) mutants (10^6 CFU/ml, initial MOI:1). Internalized bacteria were enumerated by quantitative plating after 1 h of antibiotic treatment to kill extracellular bacteria (n = 5).

DC activation by GBS infection and the importance of MyD88 adaptor protein is not serotype restricted

As MyD88 adaptor protein mediates numerous biologically important signal transduction pathways in innate immunity (51), its contribution to DC cytokine production following stimulation with GBS was investigated. BmDCs from CTRL or MyD88^{-/-} mice were

incubated with different GBS strains for 16 h. Optimal assay conditions were chosen based on previous results (28) and preliminary studies on the kinetics of cytokine release by bmDCs in response to GBS (data not shown). As we previously reported (28, 29), type III GBS-activated DCs produced significant levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α , the Th1-driving cytokine IL-12p70, the regulatory cytokine IL-10, and the chemokines CCL2, CXCL1 and CXCL10 (**Fig. 3**). The encapsulated type V GBS strain released similar levels of these cytokines than the encapsulated type III GBS strain. BmDCs were also able to produce significant amounts of the Th17-driving cytokine IL-23 and high levels of another member of the CC chemokine family, CCL3, after exposure to either types III or V GBS. In general, the non-encapsulated mutants produced similar levels of cytokines and chemokines

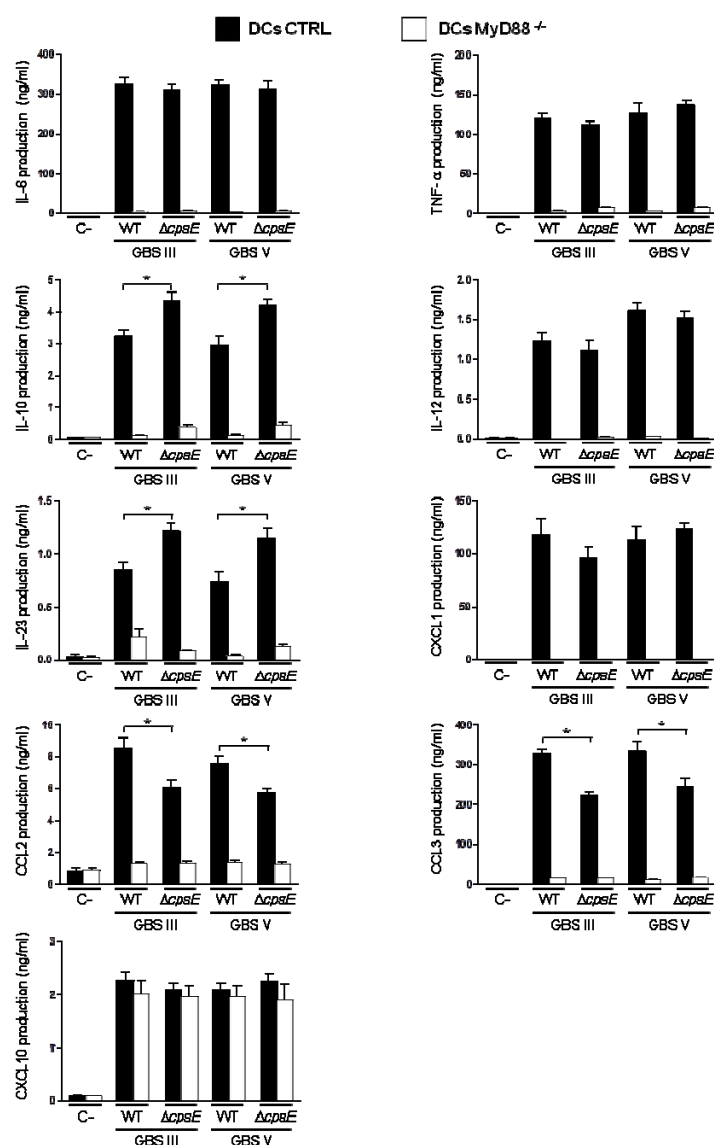


Fig. 3. Impact of MyD88 on cytokine release by DCs in response to GBS.

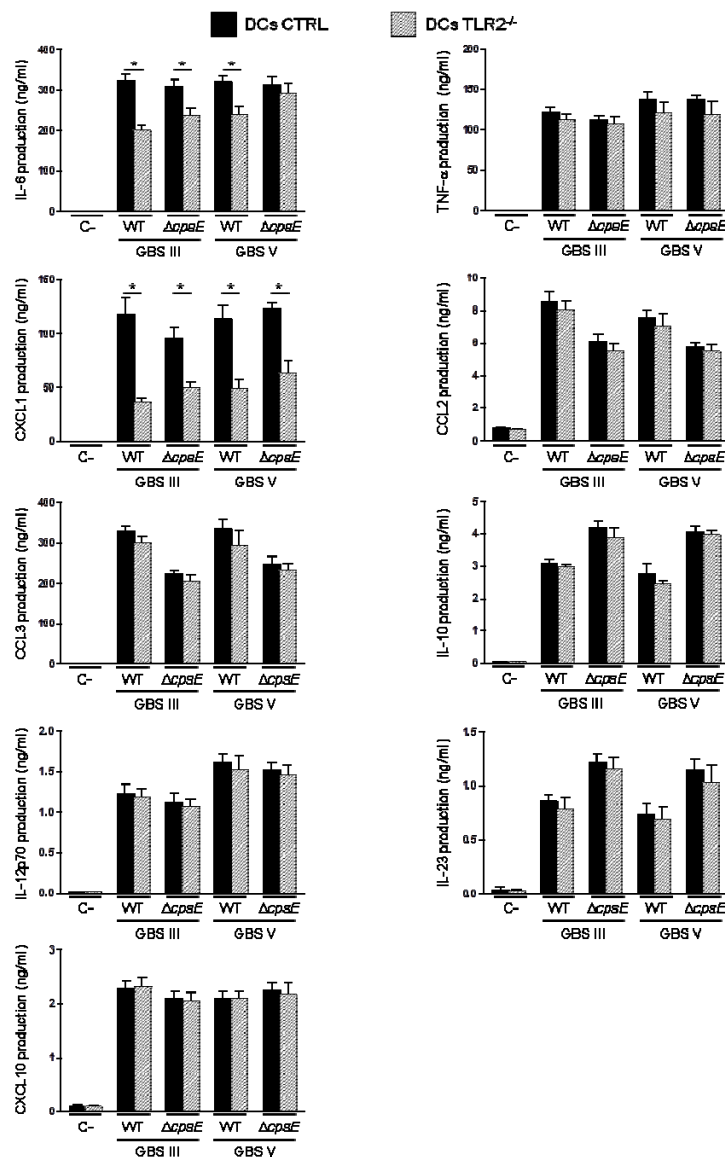
compared to respective WT strains (**Fig. 3**). Yet, the absence of CPS resulted in higher levels of IL-10 and IL-23 production by bmDCs stimulated with either serotype. We previously reported that the absence of CPS affects CCL2 production by type III GBS-infected DCs (29). The same phenotype was observed here for type V GBS. Furthermore, CCL3 production was also significantly attenuated in the non-encapsulated mutant strains for both GBS serotypes (**Fig. 3**). Thus, types III and V GBS induce similar patterns of cytokine production by DCs and this response is similarly affected by the presence of CPS in both serotypes.

Control (CTRL) or MyD88^{-/-} bmDCs were stimulated with GBS wild-type (WT) strains or their respective non-encapsulated ($\Delta cpsE$) mutants (10^6 CFU/ml, initial MOI:1). After 2 h of bmDC-GBS infection, a bacteriostatic agent (chloramphenicol, 12 μ g/ml) was added to the culture to prevent cell toxicity. Non-stimulated cells served as negative control (C-) for basal expression levels. Supernatants were harvested at 16 h of incubation and cytokine production quantified by ELISA. Data are expressed as mean \pm SEM (in ng/ml) from eight independent experiments. * $P < 0.05$, indicate statistically significant differences between WT strains and their respective non-encapsulated mutants.

With the exception of CXCL10, the production of cytokines and chemokines by bmDCs was either completely abrogated or markedly impaired in MyD88^{-/-} bmDCs for all strains tested, independently of the CPS serotype (Fig. 3, $P < 0.001$). It was demonstrated that LPS activation of MyD88^{-/-} mouse macrophages results in impaired gene expression of various chemokines but not of CXCL10 compare to CTRL cells (52). In contrast, MyD88 was partially involved in CXCL10 release by DCs exposed to the encapsulated pathogen *S. suis* (46).

TLR2 has a partial role in DC activation in response to GBS infection

The involvement of TLR2 in DC cytokine production following stimulation with GBS was also investigated using TLR2^{-/-} bmDCs. We have previously demonstrated that the production of various cytokines by type III GBS-stimulated DCs is either partially-dependent or highly-dependent on bacterial internalization (28, 29). As TLR2 was not involved in GBS internalization, we firstly focused on those cytokines that seem to be mainly triggered upon GBS contact with a cell surface receptor (IL-6, TNF- α , CXCL1, CCL2 and CCL3 (28, 29)). As shown in **Fig. 4**, only the release of IL-6 and CXCL1 was partially reduced in TLR2^{-/-} bmDCs infected by encapsulated GBS type III or type V strains ($P < 0.05$). The non-encapsulated mutant of type III GBS showed a similar dependency on TLR2 than the WT strain. In contrast, IL-6 release by bmDCs stimulated with the non-encapsulated mutant of type V GBS was not affected by the absence of TLR2, yet this response was markedly MyD88-dependent (**Fig. 3**). It is thus likely that high levels of surface exposition of cell wall components (normally hidden by the type V CPS) are able to activate cells through multiple TLRs.



The production of the cytokines IL-10, IL-12p70, IL-23 and CXCL10, known to be dependent on GBS internalization ((28) and unpublished data), was also evaluated and, as expected, no differences were observed in the capacity of TLR2^{-/-} bmDCs to produce these cytokines compared to CTRL cells after either type III or type V GBS infection (Fig. 4).

Fig. 4. Effect of TLR2 on cytokine release by DCs in response to GBS.

Control (CTRL) or TLR2^{-/-} bmDCs were stimulated with GBS wild-type (WT) strains or their respective non-encapsulated ($\Delta cpsE$) mutants (10^6 CFU/ml, initial MOI:1). After 2 h of bmDC-GBS infection, a bacteriostatic agent (chloramphenicol, 12 μ g/ml) was added to the culture to prevent cell toxicity. Non-stimulated cells served as negative control (C-) for basal expression levels. Supernatants were harvested at 16 h of incubation and cytokine production quantified by ELISA. Data are expressed as mean \pm SEM (in ng/ml) from eight independent experiments. * $P < 0.05$, indicate statistically significant differences between CTRL and TLR2^{-/-} bmDCs. Control (CTRL) or TLR2^{-/-} bmDCs were stimulated with GBS wild-type (WT) strains or their respective non-encapsulated ($\Delta cpsE$) mutants (10^6 CFU/ml, initial MOI:1). After 2 h of bmDC-GBS infection, a bacteriostatic agent (chloramphenicol, 12 μ g/ml) was added to the culture to prevent cell toxicity. Non-stimulated cells served as negative control (C-) for basal expression levels.

Supernatants were harvested at 16 h of incubation and cytokine production quantified by ELISA. Data are expressed as mean \pm SEM (in ng/ml) from eight independent experiments. * $P < 0.05$, indicate statistically significant differences between CTRL and TLR2^{-/-} bmDCs.

Previous *in vitro* studies proposed that TLR2 is involved at a certain level in GBS-induced cell activation and cytokine production. Similarly to our data, the expression of a major fraction of genes in macrophages induced by whole heat killed-type III GBS does not significantly depend on TLR2, such as *tnf*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Il-12*, and *Cxcl10*. On the other hand, and in agreement with features observed with DCs, induction of only few important molecules involved in host innate immunity, such as IL-6 and IL-1 β , was impaired in the absence of TLR2 signaling in macrophages (18). Another study reported that activation of peritoneal macrophages by whole type III GBS is independent of TLR2 and TLR6, whereas a response to the secreted heat-labile soluble factor released by type III GBS was dependent on TLR2 (17). Furthermore, lipoteichoic acid from type III GBS is recognized as a TLR2/TLR6 ligand, but does not contribute significantly to GBS cell wall mediated macrophage activation (19). Albeit induction of I κ B kinase activation (the kinase regulating NF- κ B activation) but not that of JNK and p38 MAPKs in type V GBS-infected macrophages is blocked in the absence of MyD88, it is only partially inhibited in the absence of TLR2 (23). Finally, a study using human TLR2-transfected fibroblast cell line failed to demonstrate a role of TLR2 in cell interactions with heat killed-type III GBS compared to *Listeria monocytogenes* (21). In agreement with our results, Costa *et al.* have shown that TLR2 is not responsible for the release of TNF- α by type III GBS-infected bmDCs (24). In contrast, it has been demonstrated *in vivo* for both type III and type V GBS that TLR2/MyD88 mediates TNF- α and IL-6 production and contributes to bacterial clearance in a low-dose sepsis model, whereas it is detrimental in a high-dose model of septic shock due to an enhanced inflammatory response (22). In contrast, another study reported that TLR2^{-/-} mice infected with type IV GBS show earlier and higher mortality rates and increased incidence and severity of disease than control mice at all the infecting doses employed (53). Recently, Andrade *et al.* demonstrated that TLR2-induced IL-10 production is a key event in neonatal susceptibility to type III GBS sepsis (54). Thus, the role of TLR2 in GBS immunopathogenesis remains controversial and seems to depend on the infection model, the bacterial dose and/or the GBS serotype used. Yet, overall, TLR2 does not seem to play a major role in GBS activation of immune cells.

NOD2 does not seem to play a role in DC activation in response to GBS stimulation in vitro

We have previously reported that for type III GBS, the release of IL-10, IL-12p70, CXCL10 (28) and IL-23 is dependent on bacteria internalization by bmDCs (data not shown). Thus, we evaluated the role of NOD2, an important intracellular receptor, in the production of these cytokines by bmDCs upon infection with either type III or type V GBS. Fig. 5 shows that $NOD2^{-/-}$ bmDCs produced the same amount of IL-10, IL-12p70, CXCL10 and IL-23 as CTRL bmDCs did when infected by either encapsulated type III or type V GBS, or by their respective non-encapsulated mutants. No differences were observed between CTRL bmDCs and $NOD2^{-/-}$ bmDCs in the release of other evaluated cytokines (Fig. 5; $P > 0.05$).

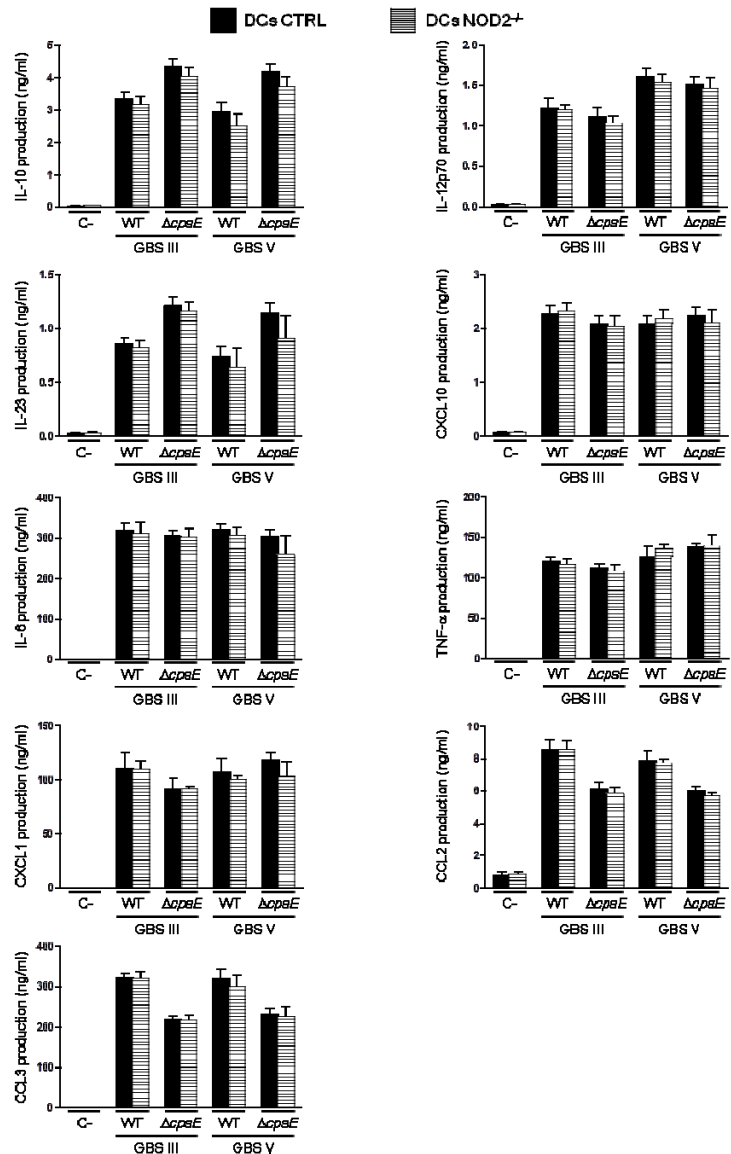


Fig. 5. Effect of NOD2 on cytokine release by DCs in response to GBS.

Control (CTRL) or $NOD2^{-/-}$ bmDCs were stimulated with GBS wild-type (WT) strains or their respective non-encapsulated ($\Delta cpsE$) mutants (10^6 CFU/ml, initial MOI:1). After 2 h of bmDC-GBS infection, a bacteriostatic agent (chloramphenicol, 12 μ g/ml) was added to the culture to prevent cell toxicity. Non-stimulated cells served as negative control (C-) for basal expression levels. Supernatants were harvested at 16 h of incubation and cytokine production quantified by ELISA. Data are expressed as mean \pm SEM (in ng/ml) from eight independent experiments.

In vitro studies performed with receptor-interacting protein 2 (RIP2) knockout macrophages, which lack NOD1 and NOD2 signaling, showed that both heat-killed and live type Ia GBS activate a potent IFN- β response similar to that of CTRL cells (26). Other study reported that NOD2 is dispensable for I κ B kinase and MAPK activation in type V GBS-infected macrophages (23). In contrast, *ex vivo* analysis of total spleen cells from type III GBS-infected mice showed that the absence of NOD2 results in reduced production of inflammatory cytokines (27). Nevertheless, results presented here suggest that DCs do not contribute to this NOD2-dependent inflammatory response and that, instead, other immune cells would be involved. For example, it has been shown that NOD1 and NOD2 are necessary for optimal IFN- γ production by iNKT cells, as well as NK cells (55).

It has been shown that *S. pneumoniae* induces production of inflammatory cytokines in primary murine microglia, astrocytes and bone marrow-derived macrophages in a NOD2-dependent manner (56, 57). In the case of *S. suis*, Lecours et al. observed that the production of IL-23 and CXCL1 by infected-DCs is partially dependent on NOD2 (46). Our results seem to indicate that other intracellular receptors might be implicated in induction of cytokine release upon GBS internalization. Costa et al. reported that activation of the inflammasome, an inflammatory signaling complex, by type III GBS mediates *in vitro* production of IL-1 β and IL-18, but not of TNF- α by DCs. Activation of the NLRP3 inflammasome requires GBS expression of β -hemolysin, an important virulence factor (24). In addition, TLR7 and TLR9 also recognize type III GBS nucleic acids in DC phagolysosomes after partial bacterial degradation, leading to IFN- β secretion (25). TLR9 sensing of type Ia GBS DNA was reported to be involved in the upregulation of TNF- α , IL-6 and IL-12 by mouse macrophages (58). In our study, the release of IL-10, IL-12p70 and IL-23 was shown to be MyD88-dependent. We speculate that TLR7 and TLR9 receptors are also implicated in the production of these cytokines by type III and type V GBS once internalized by DCs.

Conclusion

Progress has been achieved in recent years regarding our understanding of the complex interactions between GBS and DCs, especially in the context of type III GBS infection. However, due to limited information, it was unclear whether these interactions are similar or different among the diverse GBS serotypes. Here we demonstrated that type V GBS CPS partially impairs bacterial internalization, but does not improve bacterial intracellular survival, a pattern that slightly differs from that of type III GBS CPS. Interestingly, our results show that for both serotypes the TLR/MyD88 and NOD2 pathways do not modulate bacterial internalization. The TLR/MyD88 signaling cascade plays a major role in cytokine production by type III and type V GBS-infected DCs. Yet, TLR2 only partially contributes to DC activation by GBS of both serotypes. Upon internalization by DCs, both GBS types induce production of IL-10, IL-12p70 and IL-23 by a NOD2-independent but MyD88-dependent pathway, probably via an intracellular TLR. Notably, the production of the chemokine CXCL10 was shown to be MyD88/NOD2-independent. Induction of type I interferons and their regulatory pathways are probably involved in CXCL10 production. This pathway might involve TRIF activation instead of MyD88, but this remains a working hypothesis (59). Yet, a possible MyD88/TRIF-independent pathway for type I interferon production, as reported with GBS-infected macrophages cannot be ruled out (26). Altogether, our data support the hypothesis that GBS use complex TLR/MyD88-dependent in addition to TLR/NOD2-independent pathways to modulate host immune responses mediated by murine DCs.

In our model, the CPS only partially influences type III and type V GBS interactions with DCs. In fact CPS, as an antigen, only contributes to CCL2 and CCL3 production by DCs stimulated by either GBS serotype. In agreement with these results, these chemokines are the only ones produced by DCs in contact with highly purified type III or type V GBS CPS (32). In this study, CPS-mediated production of CCL3 was shown to be partially via TLR2 and MyD88-dependent pathways whereas CPS-induced CCL2 production involves TLR-independent mechanisms. Overall, no major differences were observed between type III and type V GBS in their interactions with DCs. However, further studies using multiple strains for each serotype are required to dissect the role of serotype in DC responses to GBS.

Albeit DCs and macrophages are immunologically distinct in their specific functions, surface receptors involved in GBS recognition by DCs seems to be similar to those reported in GBS interactions with macrophages. MyD88 signaling pathways are largely involved in GBS activation of both cell types, but TLR2 seems to play a minor role (17, 20, 60, 61). In contrast to surface receptors, intracellular sensing of GBS-derived molecules, including RNA and DNA, seems to occur in a cell-lineage specific manner, as reported by previous works (25, 26, 58, 61). All published studies addressing the interactions of GBS with DCs have been performed with murine-origin cells; it remains thus unclear how closely the activation of human DCs by GBS resembles the activation patterns observed with murine cells.

Acknowledgements

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through grant to MS (#342150). PL and DR are the recipients of "Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies" PhD Awards.

References

1. **Koenig JM, Keenan WJ.** 2009. Group B *Streptococcus* and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr Clin North Am* **56**:689-708.
2. **Edwards MS, Baker CJ.** 2005. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* **41**:839-847.
3. **Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, et al.** 2005. Structural and genetic diversity of Group B *Streptococcus* capsular polysaccharides. *Infect Immun* **73**:3096-3103.
4. **Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schrag SJ, Zaidi AK, et al.** 2012. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet* **379**:547-556.
5. **Davies HD, Adair C, McGeer A, Ma D, Robertson S, et al.** 2001. Antibodies to capsular polysaccharides of Group B *Streptococcus* in pregnant Canadian women: relationship to colonization status and infection in the neonate. *J Infect Dis* **184**:285-291.
6. **Skoff TH, Farley MM, Petit S, Craig AS, Schaffner W, et al.** 2009. Increasing burden of invasive Group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. *Clin Infect Dis* **49**:85-92.
7. **Amaya RA, Baker CJ, Keitel WA, Edwards MS.** 2004. Healthy elderly people lack neutrophil-mediated functional activity to type V Group B *Streptococcus*. *J Am Geriatr Soc* **52**:46-50.
8. **Sendi P, Johansson L, Norrby-Teglund A.** 2008. Invasive Group B streptococcal disease in non-pregnant adults : a review with emphasis on skin and soft-tissue infections. *Infection* **36**:100-111.
9. **Nagl M, Kacani L, Mullauer B, Lemberger EM, Stoiber H, et al.** 2002. Phagocytosis and killing of bacteria by professional phagocytes and dendritic cells. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**:1165-1168.
10. **Alvarez D, Vollmann EH, von Andrian UH.** 2008. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* **29**:325-342.
11. **Takeuchi O, Akira S.** 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**:805-820.
12. **Kawai T, Akira S.** 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**:373-384.
13. **Kawai T, Akira S.** 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* **21**:317-337.
14. **Creagh EM, O'Neill LA.** 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* **27**:352-357.
15. **Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nunez G.** 2009. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol* **4**:365-398.
16. **Koedel U.** 2009. Toll-like receptors in bacterial meningitis. *Curr Top Microbiol Immunol* **336**:15-40.
17. **Henneke P, Takeuchi O, van Strijp JA, Guttormsen HK, Smith JA, et al.** 2001. Novel engagement of CD14 and multiple toll-like receptors by Group B streptococci. *J Immunol* **167**:7069-7076.
18. **Draper DW, Bethea HN, He YW.** 2006. TLR2-dependent and -independent activation of macrophages by Group B streptococci. *Immunol Lett* **102**:202-214.

19. **Henneke P, Morath S, Uematsu S, Weichert S, Pfitzenmaier M, et al.** 2005. Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to Group B *Streptococcus*. *J Immunol* **174**:6449-6455.
20. **Henneke P, Takeuchi O, Malley R, Lien E, Ingalls RR, et al.** 2002. Cellular activation, phagocytosis, and bactericidal activity against Group B *Streptococcus* involve parallel MyD88-dependent and independent signaling pathways. *J Immunol* **169**:3970-3977.
21. **Flo TH, Halaas O, Lien E, Ryan L, Teti G, et al.** 2000. Human TLR2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by Group B streptococci or lipopolysaccharide. *J Immunol* **164**:2064-2069.
22. **Mancuso G, Midiri A, Beninati C, Biondo C, Galbo R, et al.** 2004. Dual role of TLR2 and MyD88 in a mouse model of invasive Group B streptococcal disease. *J Immunol* **172**:6324-6329.
23. **Bebien M, Hensler ME, Davanture S, Hsu LC, Karin M, et al.** 2012. The pore-forming toxin beta hemolysin/cytolysin triggers p38 MAPK-dependent IL-10 production in macrophages and inhibits innate immunity. *PLoS Pathog* **8**:e1002812.
24. **Costa A, Gupta R, Signorino G, Malara A, Cardile F, et al.** 2012. Activation of the NLRP3 inflammasome by Group B streptococci. *J Immunol* **188**:1953-1960.
25. **Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, et al.** 2009. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* **10**:587-594.
26. **Charrel-Dennis M, Latz E, Halmen KA, Trieu-Cuot P, Fitzgerald KA, et al.** 2008. TLR-independent type I interferon induction in response to an extracellular bacterial pathogen via intracellular recognition of its DNA. *Cell Host Microbe* **4**:543-554.
27. **Lemire P, Calzas C, Segura M.** 2013. The NOD2 receptor does not play a major role in the pathogenesis of Group B *Streptococcus* in mice. *Microb Pathog* **65C**:41-47.
28. **Lemire P, Houde M, Lecours MP, Fittipaldi N, Segura M.** 2012. Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells. *Microbes Infect* **14**:1064-1076.
29. **Lemire P, Houde M, Segura M.** 2012. Encapsulated Group B *Streptococcus* modulates dendritic cell functions via lipid rafts and clathrin-mediated endocytosis. *Cell Microbiol* **14**:1707-1719.
30. **Chaffin DO, Mentele LM, Rubens CE.** 2005. Sialylation of Group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by cpsK and is required for optimal capsule polymerization and expression. *J Bacteriol* **187**:4615-4626.
31. **Tettelin H, Maignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, et al.** 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:13950-13955.
32. **Calzas C, Goyette-Desjardins G, Lemire P, Gagnon F, Lachance C, et al.** 2013. Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* capsular polysaccharides induce chemokine production by dendritic cells via TLR2- and MyD88-dependent and -independent pathways. *Infect Immun* **81**:3106-3118.
33. **Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T.** 2001. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid* **46**:140-148.
34. **Segura M, Su Z, Piccirillo C, Stevenson MM.** 2007. Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression. *Eur J Immunol* **37**:1887-1904.
35. **Tyrrell GJ, Kennedy A, Shokoples SE, Sherburne RK.** 2002. Binding and invasion of HeLa and MRC-5 cells by *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology* **148**:3921-3931.

36. **Da Costa AF, Pereira CS, Santos Gda S, Carvalho TM, Hirata R, Jr., et al.** 2011. Group B *Streptococcus* serotypes III and V induce apoptosis and necrosis of human epithelial A549 cells. *Int J Mol Med* **27**:739-744.
37. **Johri AK, Margarit I, Broenstrup M, Brettoni C, Hua L, et al.** 2007. Transcriptional and proteomic profiles of Group B *Streptococcus* type V reveal potential adherence proteins associated with high-level invasion. *Infect Immun* **75**:1473-1483.
38. **dos Santos MH, da Costa AF, Ferreira BJ, Souza SL, da Silva Lannes P, et al.** 2013. A phosphoramidon-sensitive metalloprotease induces apoptosis of human endothelial cells by Group B *Streptococcus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **104**:1125-1133.
39. **Bodaszewska-Lubas M, Brzychczy-Wloch M, Adamski P, Gosiewski T, Strus M, et al.** 2013. Adherence of Group B streptococci to human rectal and vaginal epithelial cell lines in relation to capsular polysaccharides as well as alpha-like protein genes - pilot study. *Pol J Microbiol* **62**:85-90.
40. **Teixeira CF, Azevedo NL, Carvalho TM, Fuentes J, Nagao PE.** 2001. Cytochemical study of *Streptococcus agalactiae* and macrophage interaction. *Microsc Res Tech* **54**:254-259.
41. **Fujieda M, Aoyagi Y, Matsubara K, Takeuchi Y, Fujimaki W, et al.** 2012. L-ficolin and capsular polysaccharide-specific IgG in cord serum contribute synergistically to opsonophagocytic killing of serotype III and V Group B streptococci. *Infect Immun* **80**:2053-2060.
42. **Cheng Q, Carlson B, Pillai S, Eby R, Edwards L, et al.** 2001. Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of Group B streptococci. *Infect Immun* **69**:2302-2308.
43. **Blander JM, Medzhitov R.** 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* **304**:1014-1018.
44. **Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783-801.
45. **Letiembre M, Echchannaoui H, Bachmann P, Ferracin F, Nieto C, et al.** 2005. TLR2 deficiency delays pneumococcal phagocytosis and impairs oxidative killing by granulocytes. *Infect Immun* **73**:8397-8401.
46. **Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M.** 2012. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS One* **7**:e44746.
47. **Deshmukh HS, Hamburger JB, Ahn SH, McCafferty DG, Yang SR, et al.** 2009. Critical role of NOD2 in regulating the immune response to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **77**:1376-1382.
48. **Dharancy S, Body-Malapel M, Louvet A, Berrebi D, Gantier E, et al.** 2010. Neutrophil migration during liver injury is under NOD1 control. *Gastroenterology* **138**:1546-1556.
49. **Clarke TB, Weiser JN.** 2011. Intracellular sensors of extracellular bacteria. *Immunol Rev* **243**:9-25.
50. **Lysenko ES, Clarke TB, Shchepetov M, Ratner AJ, Roper DI, et al.** 2007. NOD1 signaling overcomes resistance of *Streptococcus pneumoniae* to opsonophagocytic killing. *PLoS Pathog* **3**:e118.
51. **Warner N, Nunez G.** 2013. MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction. *J Immunol* **190**:3-4.
52. **Bandow K, Kusuyama J, Shamoto M, Kakimoto K, Ohnishi T, et al.** 2012. LPS-induced chemokine expression in both MyD88-dependent and -independent

- manners is regulated by Cot/Tpl2-ERK axis in macrophages. FEBS Lett **586**:1540-1546.
53. **Puliti M, Uematsu S, Akira S, Bistoni F, Tissi L.** 2009. TLR2 deficiency is associated with enhanced severity of Group B streptococcal disease. Infect Immun **77**:1524-1531.
 54. **Andrade EB, Alves J, Madureira P, Oliveira L, Ribeiro A, et al.** 2013. TLR2-Induced IL-10 Production Impairs Neutrophil Recruitment to Infected Tissues during Neonatal Bacterial Sepsis. J Immunol **191**:4759-4768.
 55. **Selvanantham T, Escalante NK, Cruz Tleugabulova M, Fieve S, Girardin SE, et al.** 2013. NOD1 and NOD2 enhance TLR-mediated invariant NKT cell activation during bacterial infection. J Immunol **191**:5646-5654.
 56. **Davis KM, Nakamura S, Weiser JN.** 2011. NOD2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. J Clin Invest **121**:3666-3676.
 57. **Liu X, Chauhan VS, Young AB, Marriott I.** 2010. NOD2 mediates inflammatory responses of primary murine glia to *Streptococcus pneumoniae*. Glia **58**:839-847.
 58. **Talati AJ, Kim HJ, Kim YI, Yi AK, English BK.** 2008. Role of bacterial DNA in macrophage activation by Group B streptococci. Microbes Infect **10**:1106-1113.
 59. **Monroe KM, McWhirter SM, Vance RE.** 2010. Induction of type I interferons by bacteria. Cell Microbiol **12**:881-890.
 60. **Kenzel S, Santos-Sierra S, Deshmukh SD, Moeller I, Ergin B, et al.** 2009. Role of p38 and early growth response factor 1 in the macrophage response to Group B *Streptococcus*. Infect Immun **77**:2474-2481.
 61. **Deshmukh SD, Kremer B, Freudenberg M, Bauer S, Golenbock DT, et al.** 2011. Macrophages recognize streptococci through bacterial single-stranded RNA. EMBO Rep **12**:71-76.

ARTICLE VI

“Differential modulation of natural killer cell functions during the innate immune response to pathogenic streptococci ”

Paul Lemire, Tristan Galbas, Jacques Thibodeau, Mariela Segura.

.

Manuscrit en préparation pour soumission à *Journal of Immunology*

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

Je suis le premier auteur de l'article. J'ai participé activement au design expérimental, aux expériences, à l'analyse des résultats et à l'écriture de l'article.

Differential modulation of natural killer cell functions during the innate immune response to pathogenic streptococci

Paul Lemire¹, Tristan Galbas², Jacques Thibodeau², Mariela Segura^{1*}.

¹Laboratory of Immunology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada; ²Laboratory of Molecular Immunology, Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title: Interactions of pathogenic streptococci with NK cells

Keywords: Group B *Streptococcus*; *Streptococcus suis*; Natural killer cells; Dendritic cells; Capsular polysaccharide

* Corresponding author. Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada. Tel.: +1 450 773 8521, ext. 0080; fax: +1 450 778 8108.

Abstract

Dendritic cells (DCs) and natural killer (NK) cells are essential components of the innate immunity and play a crucial role in the first phase of host defense against infections. Group B *Streptococcus* (GBS) and *Streptococcus suis* are encapsulated streptococci causing severe systemic inflammation, leading to septicemia and meningitis. Yet, the involvement of NK cells in the innate immune response to encapsulated bacterial infection is poorly characterized. Here, it was observed that these two streptococcal species rapidly induce the release of IFN- γ *in vivo* and that NK cells are the major cell type responsible for this production during the acute phase of the infection. Nevertheless, *S. suis* capacity to activate NK cells was lower than that observed for GBS. *In vitro*, IFN- γ release by NK cells required the presence of DCs. In turn, NK cell activation had a synergistic effect on DC cytokine production. IFN- γ release in response to bacterial stimulation was mainly mediated by direct DC-NK cell contact and partially dependant of soluble factors. Albeit, IL-12 and LFA-1 were shown to be critical in *S. suis*-mediated activation of the DC-NK cell crosstalk, different or redundant molecular pathways modulate DC-NK crosstalk during GBS infection. The bacterial capsular polysaccharides differently modulated NK cell release of IFN- γ production upon GBS or *S. suis* infection. Together, these results demonstrated a role of NK cells in the innate immune response against encapsulated streptococcal infections and the involvement of a complex DC-NK crosstalk which is differently modulated by GBS and *S. suis*.

Abbreviations

APC	allophycocyanin	IFN	interferon
CCL	chemokine ligand	IL	interleukin
CFU	colony-forming unit	I.P.	intraperitoneal
CPS	capsular polysaccharide	LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand	MACS	magnetic-activated cell sorting
CXCR	CXC chemokine receptor	MOI	multiplicity of infection
DC	dendritic cell	PE	phycoerythrin
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	PE-Cy7	phycoerythrin-cyanine 7
FACS	fluorescence-activated cell sorting	NK	natural killer
FITC	fluorescein isothiocyanate	NKT	natural killer t
GBS	Group B <i>Streptococcus</i>	STSLs	streptococcal toxic shock-like syndrome
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor	TLR	Toll-like receptor
IC	intracellular	TNF	tumor necrosis factor

Introduction

Streptococcus suis and Group B *Streptococcus* (GBS, or *Streptococcus agalactiae*) are two encapsulated pathogens that induce similar pathologies, including septicemia and meningitis in animals and/or humans. Among ten GBS serotypes that have been characterized (1-3), type III GBS is the most common type in neonatal meningitis (3, 4) while type V GBS has long been recognized as a leading cause of invasive disease in adults (2, 5). *S. suis* is not only a major swine pathogen but also emerging threat to human health, especially in Asian countries (6, 7). *S. suis* is now the leading cause of adult meningitis in Vietnam, the second in Thailand and the third in Hong Kong (7). Among 35 *S. suis* serotypes that have been described, type 2 *S. suis* is the most virulent for both pigs and humans, and most of the studies have been performed with this serotype (8). In addition, type 14 *S. suis* is also emerging as a zoonotic agent (9).

The capsular polysaccharide (CPS) defines the serotype and is considered a key virulence factor for both bacterial species (6, 7, 10, 11). Indeed, these two streptococci are the sole Gram-positive bacteria harboring a side chain terminated by sialic acid in their CPS composition. In spite of this and other CPS biochemical and structural similarities (10, 12, 13), GBS and *S. suis* pathogenic mechanisms and interplay with components of the immune systems seem to radically differ (6, 11, 14-18). Experiments using non-encapsulated mutants have shown that type 2 and type 14 *S. suis* CPSs have a strong antiphagocytic effect and severely interfere with the release of cytokines by *S. suis*-infected antigen-presenting cells (APCs). In contrast, encapsulated type III or type V GBS are easily internalized by APCs and cytokine production is only partially modified or unaltered by the presence of CPS (15-23).

Protective immunity requires the coordinated activation of both the innate and adaptive immune systems. Interactions between innate and adaptive immune effectors are essential for the efficient control of pathogens and often play an important role in ending immune responses which would otherwise eventually be harmful to the host. During infection, myeloid cells play a key role not only as first line of defense but also as key cells that contribute to the activation of other innate immune cells, such as natural killer (NK) cells. Dendritic cells (DCs) are recognized as the most powerful APCs that initiate immune responses against pathogens and are considered an essential link between innate and

adaptive immunity. Consequently, the interactions between DCs and other immune cells can strongly influence the outcome of a disease, and more importantly the magnitude and phenotype of the ensuing adaptive immune response to the invading pathogen. NK cells are large granular lymphocytes recognized as playing a pivotal role in the innate immune response mainly against viruses. However, recent studies provided strong evidence for the participation of NK cells in the innate immune response to bacterial infections (24) via the production of pro-inflammatory cytokines, such as interferon gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (25-29). Indeed, NK cells possess receptors allowing them to sense and respond to viral and bacterial patterns, including Toll-like receptors (TLRs).

Several studies have demonstrated that the crosstalk between DCs and NK cells can potentiate each other efficiency (30, 31). Stimulation of DCs drives the production of key NK cell-activating cytokines, such as IL-12 and IL-18, in addition to enhancing cell-cell contact between DCs and NK cells. This DC-NK cell crosstalk or synapse is known to be important in NK cell activation, IFN- γ production and acquisition of effector functions (30, 32, 33). In return, NK cells contribute to DC maturation and activation. Nevertheless, few studies have addressed the role of DC-NK cell crosstalk, which might represent a major and early source of IFN- γ production, during streptococcal infections (34-36). Indeed, among pro-inflammatory cytokines, IFN- γ has gained much interest over the years for its important beneficial role in controlling GBS infections. In fact, it was shown that IL-12 and IL-18 mediate their therapeutic effects by increasing IFN- γ production by responding immune cells (37-39). A protective role of IFN- γ was also shown in type III and type V GBS infections in mice (40). Furthermore, IFN- γ production is severely impaired during early life and might partly explain the susceptibility of neonates to GBS infection (37, 41, 42). Similarly, clinical and epidemiological data from type 2 *S. suis*-infected patients showed that during the early phase of the disease, serum levels of IFN- γ , and other inflammatory cytokines, are extremely high (43). Mice experimentally infected with virulent type 2 *S. suis* strains showed increased systemic levels of IFN- γ expression early after infection (35). Albeit NK cells have been suggested as a potential source of IFN- γ production during either type III GBS or type 2 *S. suis* infections (35, 44), modulation of the DC-NK cell crosstalk by these two pathogenic streptococci has never been addressed before.

Based on these observations and previous findings on GBS and *S. suis* interactions with DCs, the hypothesis of this study is that GBS and *S. suis* drive NK cell production of IFN- γ and other inflammatory cytokines that depend on the formation of a DC-NK cell synapse. We also hypothesize that the bacterial CPSs differentially modulates these interactions. To this aim, we investigated *ex vivo* the role of NK cells during the innate immune response against type III GBS or type 2 *S. suis*. *In vitro* DC-NK co-culture systems were used to further dissect the molecular pathways leading to NK cell activation and to evaluate the role of the CPS by studying different GBS or *S. suis* capsular serotypes and respective non-encapsulated mutants.

Materials and Methods

Ethics Statement

All experiments involving mice were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the Animal Welfare Committee of the University of Montreal.

Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. All strains were grown in Todd-Hewitt Broth (THB) or agar (THA) (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) or on sheep blood agar plates at 37°C for 18 h as previously described (18, 20). To perform *in vitro* studies, isolated GBS or *S. suis* colonies were inoculated in THB, incubated for 10 h (*S. suis*) or 16 h (GBS) at 37°C with shaking. Working cultures were obtained by inoculating 100 μ l of these cultures into 10 ml of THB followed by incubation for 5 h at 37°C with shaking. Bacteria were washed twice in PBS, pH 7.3 and appropriately diluted in antibiotic-free cell culture medium. For mouse infections, bacterial cultures were prepared as previously described (45). Briefly, isolated colonies were inoculated in 5 ml of THB and incubated for 8 h at 37°C with shaking. Working cultures were prepared by transferring 10 μ l of 1/1000 dilutions of 8 h-cultures into 30 ml of THB which was incubated for an additional 12 h (GBS) or 16 h (*S. suis*) at 37°C with agitation. Bacteria were washed twice with PBS pH 7.3 before being appropriately diluted in fresh THB to desired inoculum concentrations. The

number of CFU/ml in the final suspensions was determined by plating serial dilutions of working cultures on THA using an Autoplate 4000 Automated Spiral Plater (Spiral Biotech, Norwood, MA, USA).

Table I. Bacterial strains used in this study

Strains	General characteristics	Source/Reference
<u>Group B <i>Streptococcus</i></u>		
COH-1	Wild-type, encapsulated and virulent strain isolated from an infant with septicemia and meningitis in United States of America. Serotype III.	(46)
$\Delta cpsE$	Non-encapsulated mutant derived from strain COH-1. Deletion of the <i>cpsE</i> gene.	(18)
CJB111	Wild-type, encapsulated and virulent strain isolated from a neonate with septicemia in United States of America. Serotype V.	(47)
$\Delta cpsE$	Non-encapsulated mutant derived from strain CJB111. Deletion of the <i>cpsE</i> gene.	(22)
<u><i>Streptococcus suis</i></u>		
P1/7	Wild-type, encapsulated and virulent strain isolated from a pig with meningitis in United Kingdom. Serotype 2.	(48)
$\Delta cpsF$	Non-encapsulated mutant derived from strain P1/7. Deletion of the <i>cpsF</i> gene.	(16)
DAN13730	Wild-type, encapsulated and virulent strain isolated from a human with meningitis in Netherlands. Serotype 14.	(49)
$\Delta cps14b$	Non-encapsulated mutant derived from strain DAN13730. Deletion of the <i>cpsB</i> gene.	(21)

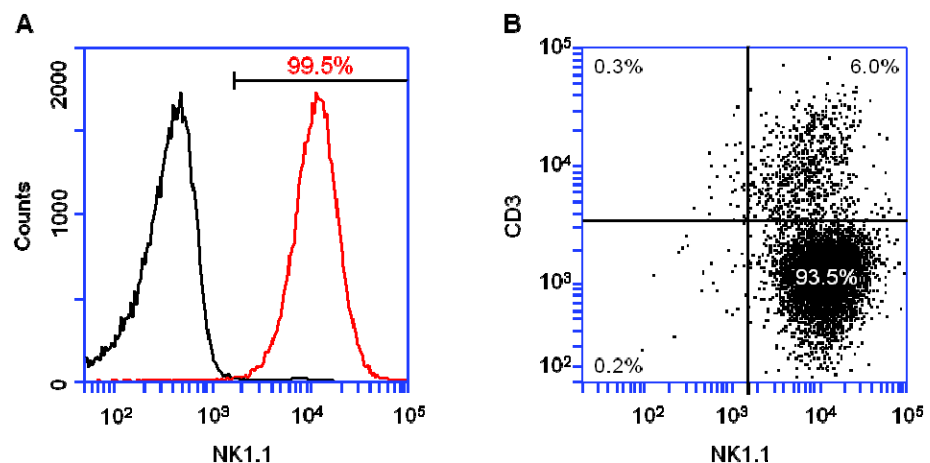
Generation of bone marrow-derived dendritic cells

Bone marrow-derived DCs were generated from C57BL/6 female mice 5-week-old (Charles River Laboratories, St-Constant, QC, Canada) according to a technique described elsewhere (18, 20). Briefly, after red blood cell lysis, total bone marrow cells (2.5×10^5 cells/ml) were cultured in complete medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 20 μ g/ml gentamycin, 100 U/ml penicillin-streptomycin, 2 mM L-glutamine and 50 μ M 2-mercaptoethanol. All reagents were from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). Complete medium was complemented

with 20% GM-CSF from a mouse GM-CSF transfected cell line (Ag8653) as a source of GM-CSF (50). Cells were cultured for 7 days at 37°C with 5% CO₂. On day 7, clusters were harvested and subcultured overnight to remove adherent cells. Non-adherent cells were collected on day 8 and used as immature DCs for the studies. Cell purity was routinely \geq 88% CD11c^{high} cells as determined by FACS analysis and as previously reported (18).

Culture of splenic natural killer cells

Untouched NK cells were purified from naive C57BL/6 mice by negative selection using NK cell isolation kit II microbeads and magnetically activated cell sorting (MACS; Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). Purified NK cells were either used as freshly isolated cells or expanded *in vitro* for 8 days at 37 °C with 5% CO₂ in complete RPMI 1640 medium supplemented with 500 ng/ml of recombinant mouse IL-2 (Miltenyi Biotec) as previously reported (35, 51-53). The resulting NK cell purity of expanded cultures was routinely >93% NK1.1⁺ and CD3⁻ as determined by FACS using anti-mouse NK1.1 (clone PK-136) and anti-mouse CD3 (clone 17A2) from BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada) (Supplemental Fig. 1).



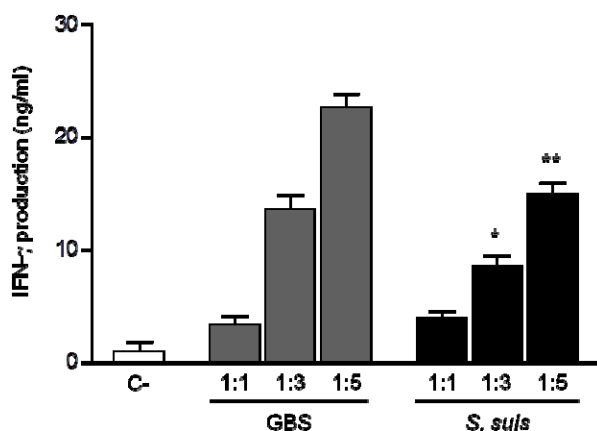
Supplemental Fig. 1. Purity levels of culture-expanded NK cells.

Untouched NK cells were purified from spleens of naive C57BL/6 mice by negative selection using magnetically activated cell sorting. Purified NK cells were expanded *in vitro* for 8 days at 37 °C with 5% CO₂ in complete RPMI 1640 medium supplemented with 500 ng/ml of recombinant mouse IL-2 **(A)** Histogram showing % of cells expressing the surface marker NK1.1 as analyzed by FACS. The black line corresponds to the non-labeled cells and the red line

corresponds to NK1.1+ cells. **(B)** Dot plots showing % of NK1.1+, CD3+, double positive or double negative cell populations within the NK cell culture as analyzed by FACS.

NK and DC co-cultures

DC and NK cell (DC-NK) co-cultures were established at a ratio of 1:3 in complete, antibiotic-free medium. This ratio was determined after standardization with different ratios of DCs and NK cells (Supplemental Fig. 2). Unless otherwise indicated NKs states for culture-expanded splenic NK cells.



Supplemental Fig. 2. Determination of optimal DC: NK ratio for co-cultures.

IFN-γ levels were measured in DC and NK cell co-cultures established at ratios of 1:1, 1:3 or 1:5 (DC:NK). Co-cultures were infected *in vitro* with either type III GBS strain COH-1 or type 2 *S. suis* strain P1/7 (2.5×10^5 CFU, initial DC-bacteria MOI:1). After a bacterium-cell contact incubation

time of 2 h or 6 h, chloramphenicol (for GBS) or gentamycin (for *S. suis*) was added to prevent cell toxicity, respectively. Supernatants were collected at 14 h of incubation, and IFN-γ levels were measured by ELISA. Non-stimulated cells (medium alone) served as negative (C-) control. Data represent mean values (in ng/ml) \pm SEMs of three distinct experiments. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$, indicate statistically significant differences between type III GBS and type 2 *S. suis* strains for the same ratio.

The ratio of 1:3 was chosen as allowed to obtain a significant production of IFN-γ using a lower number of NK cells and thus reducing the number of animals required for the experiments, as requested by the Animal Welfare Committee of the University of Montreal. Co-cultures were infected with 2.5×10^5 CFU of different GBS or *S. suis* strains (initial MOI:1 to DCs). After a bacterium-cell contact time of 2 h for GBS and 6 h for *S. suis*, chloramphenicol (CM, 12 μg/ml; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) or gentamicin (20 μg/ml, Life Technologies) was added to the cultures to prevent cell toxicity, respectively. CM

is a bacteriostatic agent, keeping a low and controlled level of bacteria through the incubation period, as previously reported (18, 20). To control *S. suis* overgrowth, a bactericidal agent (gentamicin) was needed instead of CM (35). Albeit slightly different, these well-standardized culture conditions allowed obtaining an optimal antigenic stimulus and thus DC activation for each pathogen. Supernatants were collected after a final 14 h of incubation. Non-stimulated cells (medium alone) served as negative control. In addition, single DC or NK cell cultures were also included as controls. In selected experiments, a Transwell® system was incorporated to the DC-NK co-cultures. A Transwell® insert with a 0.4 µm pore size polycarbonate membrane was placed in 24-well flat bottom Nunc plates (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). NK cells were placed in the lower compartment. DCs were placed in the upper compartment of the Transwell® insert. GBS or *S. suis* strains (initial MOI:1 to DCs) were added to both, the upper and the lower compartments, and co-cultures were incubated as described above. In some experiments, NK cells were cultured alone in the presence of non-diluted supernatants obtained from 14 h-infected DCs (GBS or *S. suis*) at a initial MOI:1.

For inhibition assays, DCs and/or NK cells were pre-treated 1 h prior to bacterial infection with anti-mouse IL-12 (20 µg/ml; clone C17.8, rat IgG_{2a}) anti-mouse CD314/NKG2D (10 µg/ml; clone C7, Armenian Hamster IgG), anti-mouse CD11a/LFA-1 (10 µg/ml; clone M17/4, rat IgG_{2a}) or isotype controls (rat IgG_{2a} and Armenian hamster IgG). All antibodies were from e-Bioscience (San Diego, CA, USA). Doses of neutralizing antibodies were selected in pre-tests and/or based on the literature (36, 54-58).

All solutions and bacterial preparations used in these experiments were tested for the absence of endotoxin contamination using a *Limulus* amebocyte lysate test (Pyrotell, STV, Cape Cod, MA, USA) with a sensitivity limit of 0.03 EU/ml.

Ex vivo analysis of total splenocytes

C57BL/6 female, 5-week-old mice (Charles River Laboratories) were injected intra-peritoneally (i.p) with a dose of 1×10^7 CFU of type III GBS strain COH-1 or 5×10^7 CFU of type 2 *S. suis* strain P1/7. Mouse models of infection, including injection dose, for these two bacterial strains have been previously standardized (35, 45, 59, 60). Control mice were injected with the vehicle solution (sterile THB). Spleens from infected mice with clinical signs

of disease and positive bacteremia ($\sim 1\text{-}5 \times 10^8$ CFU/ml of blood) were harvested 6 h post-infection ($n = 3$ per group \times 3 individual experimental infections), perfused with complete RPMI medium (without antibiotics), teased apart, and pressed gently through a sterile fine wire mesh. After red blood cells lysis and washing, total splenocytes were counted and plated at a concentration of 5×10^6 cells/ml in complete RPMI medium in 24-well flat bottom plates, and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 5 h and 14 h. Antibiotics were added to the cultures to prevent cell toxicity as described above (35, 45). Total splenocytes from control (placebo) animals were similarly treated. Brefeldin A (3 μ g/ml), an inhibitor of protein secretion, was added during the last 5 h, and total splenocytes were analyzed by IC-FACS (see below). In selected experiments, Brefeldin A (400 μ g/ml) was injected i.p. directly to mice 5 h prior to spleen collection and cells were directly analyzed by IC-FACS (without an *ex vivo* incubation step).

Cytokine quantification by ELISA

Levels of IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- γ , TNF- α , CXCL9 (MIG), and CXCL10 (IP-10) in cell culture supernatants were measured by sandwich ELISA using pair-matched antibodies from R&D Systems or eBioscience, according to the manufacturer's recommendations. Twofold dilutions of recombinant mouse cytokines were used to generate standard curves. Sample dilutions giving OD readings in the linear portion of the appropriate standard curve were used to quantify the levels of each cytokine. The results are from at least three independent ELISA measurements.

FACS analysis

For cell surface staining of total spleen cells, 10^6 cells were washed and treated for 15 min on ice with FcR-blocking reagent (Fc γ III/II R α Ab) in sorting buffer (PBS-1% fetal bovine serum). Blocked cells were then incubated with different combinations of the following antibodies: PECy7-conjugated anti-NK1.1 mAb (clone PK136), PE-conjugated anti-CD19 (clone 6D5), FITC-conjugated anti-CD3 (clone 17A2) and/or PE-conjugated anti-CD69 mAb (clone H1.2F3) for 30 min on ice. For intracellular staining, cells were fixed, permeabilized and incubated with APC-conjugated anti-mouse IFN- γ (clone XMG1.2) or APC-conjugated anti-mouse TNF- α (clone MP6-259 XT22) for 45 min at room temperature. All reagents were from BD Biosciences. FACS was either performed using an Accuri™ C6

instrument or a FACSCanto II instrument (BD Biosciences). For analysis using the Accuri™ C6 instrument, twenty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using BD Accuri C6 Software. Quadrants were drawn based on control stains and were plotted on logarithmic scales. For analysis using the FACSCanto II instrument, fifty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using FACSDiva™ software. Fluorescence Minus One (FMO) control staining was performed for proper analysis and gating of target cells.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM and analyzed for significance using Student's unpaired t-test. All analyses were performed using the Sigma Plot System (v.9; Systat Software). A $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results

*NK cells rapidly produce IFN- γ in response to either GBS or *S. suis*, yet important inter-species differences are observed*

Before characterizing the mechanisms underlying NK cell activation in response to GBS or *S. suis*, we were interested in understanding the importance of NK cells in the acute phase of systemic infections by these two pathogens. To this aim spleens from infected mice were collected 6 h of post-infection, at the onset of the first clinical signs of disease. As plasma levels of IFN- γ are in general very low and difficult to quantify by ELISA (37, 39, 45, 57), intracellular levels of this cytokine were analyzed *ex vivo* in total splenocyte cultures, which also allows identification of cellular sources. As shown in Fig. 1A, the overall IFN- γ production increased following infection with type III GBS in a time-dependent manner. The NK1.1⁺ cells were shown to be the major producers of IFN- γ after 5 h of *ex vivo* incubation; however, at later time points (14 h of *ex vivo* incubation) the % of IFN- γ -secreting NK1.1⁺ cells also increased, suggesting a role of NK cells in the early boost of IFN- γ which is then amplified by other immune cells during type III GBS infection. As NK1.1⁺ cells account for only 3-5% of total splenocytes it is difficult to accurately visualize the production of IFN- γ by these cells within the whole spleen cell population. To improve detection of this cytokine by IC-FACS, we analyzed IFN- γ expression on 10,000 NK1.1⁺ gated cells (Fig. 1B) and

confirmed the previous data. The number of IFN- γ -producing NK1.1+ increased overtime in type III GBS-infected mice and was significantly higher than that of the non-infected controls (Fig. 1B).

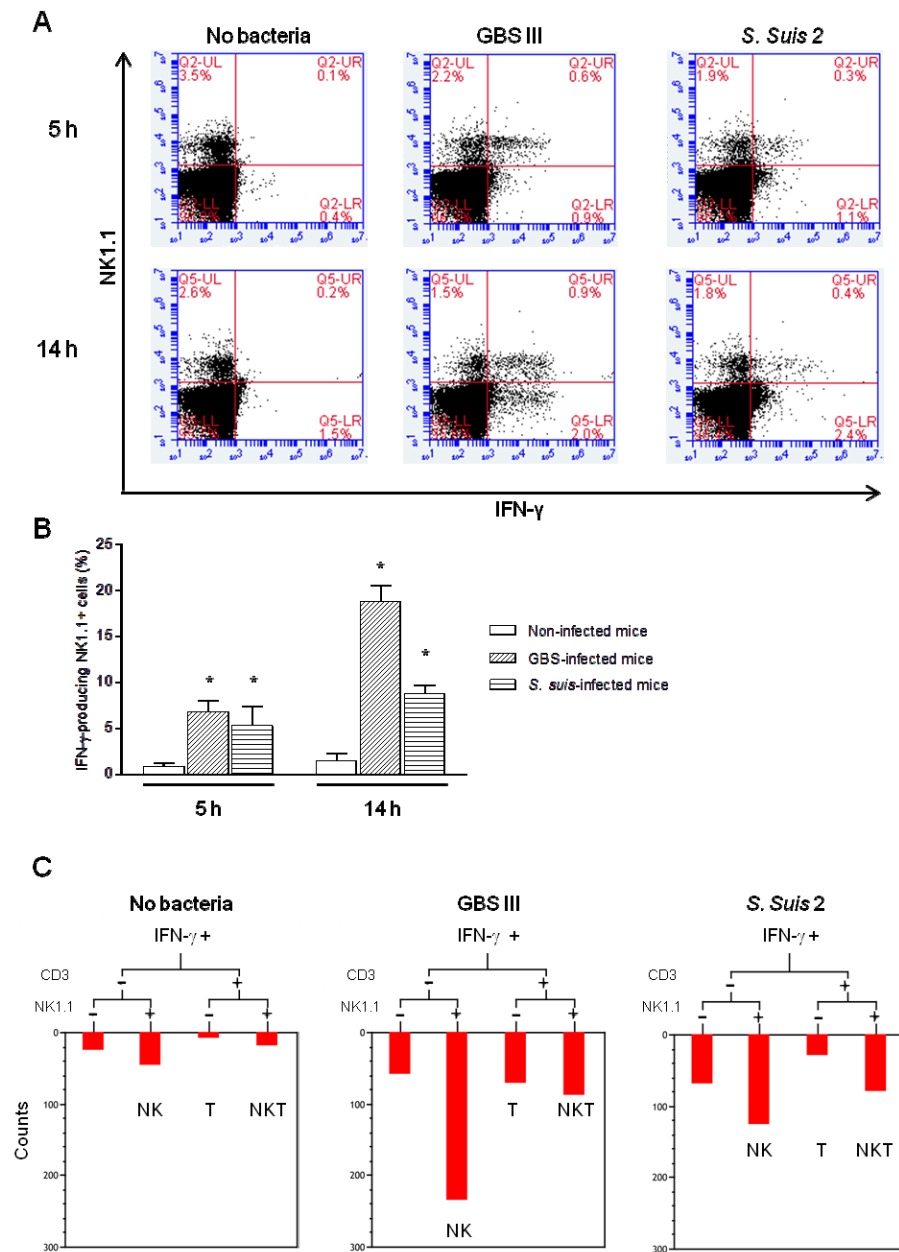


Fig. 1. Ex vivo analyses of cellular sources of IFN- γ during the acute phase of streptococcal infections.

Mice were infected intra-peritoneally with a dose of 1×10^7 of type III GBS wild-type strain COH-1 or 5×10^7 CFU of type 2 *S. suis* wild-type strain P1/7 ($n = 3$ per group \times 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h post-infection and total splenocytes plated

at 5×10^6 cells/well. Chloramphenicol (for GBS) or gentamycin (for *S. suis*) was added to the cultures to prevent cell toxicity. Non-stimulated cells from mock-infected animals served as negative control for basal expression (Non-infected). Total splenocytes were incubated for 5 h or 14 h with brefeldin A (3 μ g/ml) added during the last 5 h of incubation. Cells were harvested and intracellularly stained for IFN- γ in combination with NK1.1 surface staining or in combination with several surface markers for multi-parametric FACS analysis **(C)**. For **(B)**, IFN- γ expression was analyzed on 10,000 NK1.1+ gated cells and data expressed as means \pm SEM from 3 different experimental infections. * $P < 0.05$, indicates statistically significant difference compared to non-infected control mice. # $P < 0.05$, indicates statistically significant difference between type III GBS- and type 2 *S. suis*-infected mice. **(C)** Number of IFN- γ + cells within different spleen cell populations at 5 h. Representative data from 3 different experimental infections. Dot-line indicates an increase in IFN- γ production over non-infected controls.

As NK1.1+ cells include NK and NKT cells, to specifically dissect the role of NK cells and the potential contribution of other immune cells to IFN- γ production, multi-parametric IC-FACS analyses of total splenocytes from type III GBS-infected mice were performed. NK cells (NK1.1+CD3 $^-$) contributed to approximately 75% of the IFN- γ production after 5 h of *ex vivo* incubation (Fig. 1C) whereas NKT (NK1.1+CD3+) and T cells (CD3+) accounted each for less than 15% and 7.5% of this production, respectively. B cells (CD19+ cells) did not produce significant levels of this cytokine (data not shown). As shown in Fig. 1A, differences in the relative contribution of distinct cell types to IFN- γ production disappeared with time; yet NK cells represented approximately 50% of the IFN- γ -producing cells after 14 h of *ex vivo* incubation with an increasing contribution of CD3+ T cells [data not shown and (62)].

The pattern of IFN- γ production after type 2 *S. suis*-infection differed from than observed for type III GBS (Fig. 1A). First, total IFN- γ production by spleen cells was lower than that observed for type III GBS. Albeit NK1.1+ cells were also important producers of this cytokine, levels were low and did not seem to increase over time (Fig. 1A). Indeed, by analyzing 10,000 NK1.1+ gated cells, a significant increase in IFN- γ production was observed compared to uninfected controls. However, and in contrast to type III GBS, this production remained stable across time (Fig. 1B). Multi-parametric analysis on splenocytes from type 2 *S. suis*-infected mice showed that NK cells (NK1.1+CD3 $^-$) accounted for approximately 66% of the IFN- γ production after 5 h of *ex vivo* incubation. NKT cells (NK1.1+CD3+) were the second most important IFN- γ -producing cells (33%), while T and B

cells produced no significant levels of IFN- γ at early time points (Figure 1C and data not shown). At 14 h of *ex vivo* incubation, an increase in the % IFN- γ -producing CD3+ T cells was observed in *S. suis*-infected mice, yet this increase was less marked than that observed for type III GBS [Fig. 1A; data not shown and (63)].

Streptococcal infections increase surface expression of CD69 but fail to induce TNF- α production by NK1.1+ cells

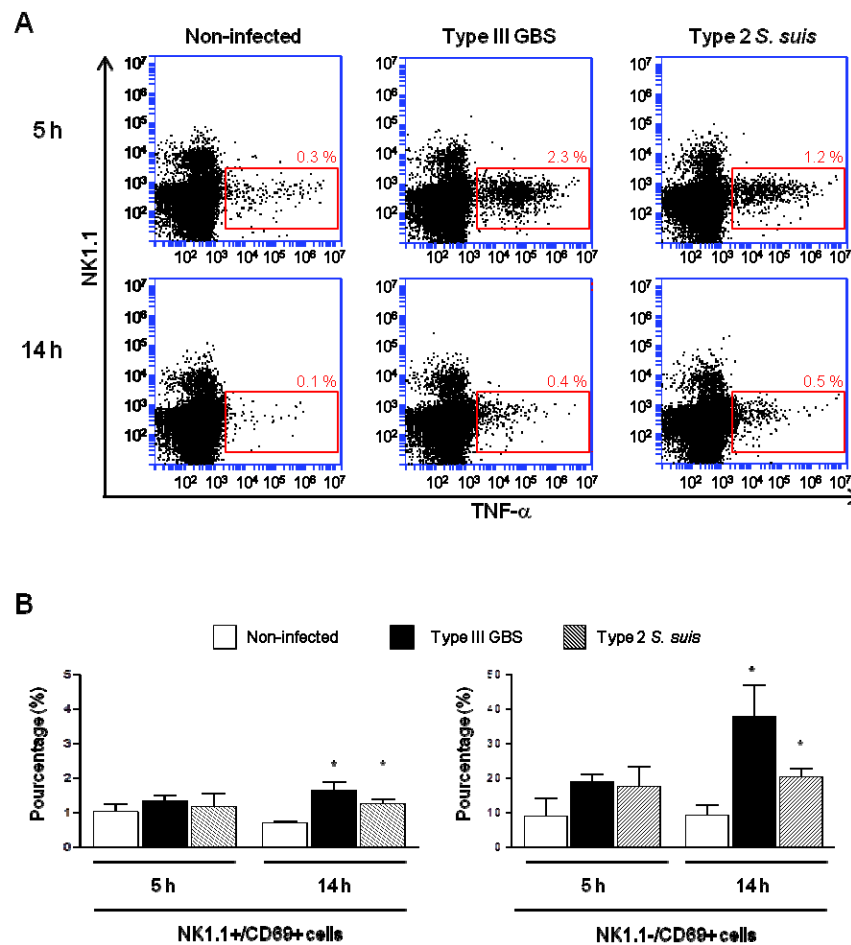


Fig. 2. TNF- α production and CD69 expression by NK1.1+ cells during the acute phase of streptococcal infections.

Mice were infected intra-peritoneally with a dose of 1×10^7 of type III GBS wild-type strain COH-1 or 5×10^7 CFU of type 2 *S. suis* wild-type strain P1/7 ($n = 3$ per group \times 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h post-infection and total splenocytes plated at 5×10^6 cells/well. Chloramphenicol (for GBS) or gentamycin (for *S. suis*) was added to the culture to prevent cell toxicity. Non-stimulated cells from mock-infected animals served as

negative control for basal expression (Non-infected). Total splenocytes were incubated for 5 h or 14 h with brefeldin A (3 μ g/ml) added during the last 5 h of incubation. Cells were harvested and intracellularly stained for TNF- α **(A)** or surface stained for CD69 **(B)** in combination with NK1.1 surface staining. **(A)** % of TNF- α ⁺ cells within the NK1.1⁻ cell population are indicated. Representative data from 3 different experimental infections. **(B)** % of CD69⁺ cells within the NK1.1⁺ or the NK1.1⁻ cell populations of the spleen. Data are expressed as means \pm SEM from 3 different experimental infections. * P < 0.05, indicates statistically significant difference compared to non-infected control mice.

To measure the ability of GBS or *S. suis* to induce optimal activation of NK1.1⁺ cells, we measure surface expression of CD69 and the production of TNF- α , a cytokine described to be produced by these cells in the context of infection. An early increase in TNF- α production was observed in total splenocytes from either type III GBS- or type 2 *S. suis*-infected mice. This production decreased over time (Fig. 2A). Nevertheless, NK1.1⁺ cells were negative for TNF- α intracellular staining, suggesting that this cytokine production was generated mainly by cells of the innate immune system within the NK1.1⁻ population during a streptococcal infection. It should be mentioned that neither the analysis of 10,000 NK1.1⁺ gated cells nor the analysis of NK1.1⁺ cells directly *in vivo* (without an *ex vivo* incubation step) allowed detection of a significant production of TNF- α by NK1.1⁺ cells (data not shown). Total splenocytes from infected animals also showed a time-dependent increase in surface expression of the early activation marker CD69 (Fig. 2B). CD69 expression was observed in both NK1.1⁺ and NK1.1⁻ spleen sub-populations (Fig. 2B).

Taken as a whole, *ex vivo* analyses of total splenocytes from infected mice suggest that NK cells, in the context of GBS or *S. suis* infections, rapidly produce IFN- γ , increase CD69 expression at their surface but do not contribute to the total TNF- α production by infected splenic cells. Yet, type 2 *S. suis*-infected mice showed an overall lower innate immune response compared to a similar systemic infection with type III GBS. Interestingly, a reduction in the percentage of NK1.1⁺ cells was noticed following infection by GBS or *S. suis*. By analyzing the quantity of NK1.1⁺ cells after 6 h of *in vivo* infection, a significant decrease in the quantity of NK1.1⁺ cells (around 30-40%, ** P < 0.01) compared to non-infected controls was observed for both pathogens (Fig. 3). These results suggest either a trafficking of NK1.1⁺ cells to the infection sites or could be a consequence of their apoptosis (64).

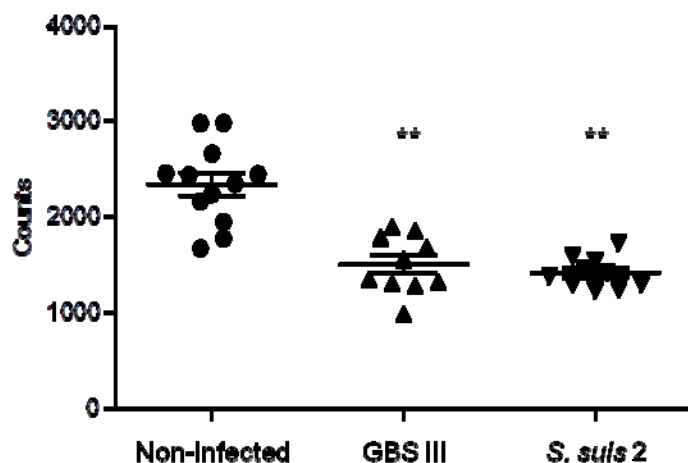


Fig. 3. NK1.1+ population decrease after GBS or *S. suis* infection.

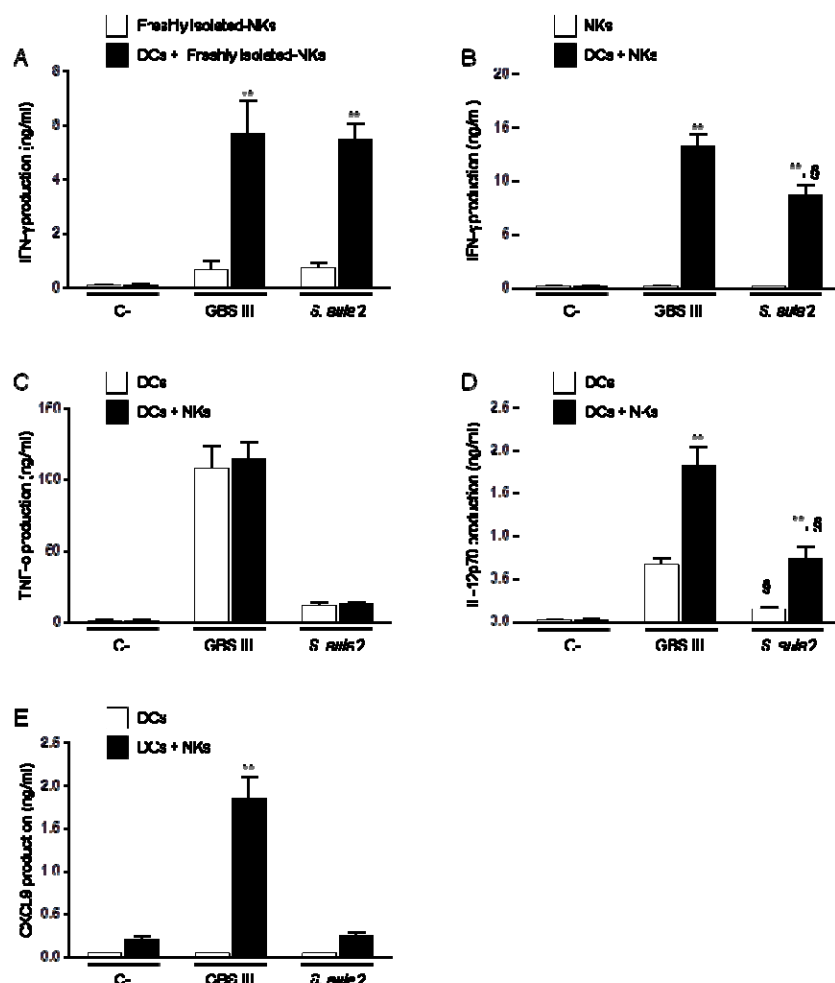
Mice were infected intra-peritoneally with a dose of 1×10^7 of type III GBS wild-type strain COH-1 or 5×10^7 CFU of type 2 *S. suis* wild-type strain P1/7 ($n = 10$ per group of infected mice). Non-infected (placebo) animals served as controls ($n = 12$). Spleens were harvested 6 h post-infection and stained for NK1.1+ cell population. Data are expressed as individual mouse values (in %). ** $P < 0.01$, indicates statistically significant difference compared to non-infected control mice.

DCs are required for IFN- γ production by NK cells in response to encapsulated streptococci

The fact that TLRs have been recently discovered to be expressed by NK cells has opened a new interest in their putative involvement in the innate immune response to bacterial infections (25). Some studies reported a direct interaction of bacteria or bacterial components with NK cells (25, 33, 65-72). To evaluate the possibility that NK cells can be directly activated by live encapsulated streptococci, we incubated freshly isolated-NK cells from naïve mice with type III GBS or type 2 *S. suis* (MOI:1) for 14 h *in vitro*. As displayed in Fig. 4A, NK cells produced low amounts of IFN- γ in direct contact with these two pathogenic streptococci. Freshly, MACS-purified splenic NK cells might contain contamination with other immune cells, such as APCs. Thus, to increase purity and yield, we used an *in vitro* expanded culture of splenic NK cells supplemented with IL-2 to confirm the obtained data. The purity of expanded NK cells was higher than 93% of NK1.1+CD3⁻ cells, and more importantly, did not contain contaminating NK1.1⁻ APCs (Supplemental Fig. 1). Using this highly pure culture of NK cells, production of IFN- γ after direct contact with either GBS or *S. suis* was not significantly different from non-infected control cells (Figure 4B). Similar data

were obtained when other cytokines were tested or when different bacterial MOIs were used (data not shown).

To assess the importance of accessory cells in the activation of NK cells by type III GBS or type 2 *S. suis*, NK cells were co-cultured with DCs, as a source of APCs. A marked increase in IFN- γ production was observed in infected DC-NK cell co-cultures compared to non-infected counterparts or compared to infected-NK cell single cultures. This increase was observed when using either freshly isolated- or expanded-NK cells (Fig. 4A and B), and was dependent on the number of NK cells in the co-culture (Supplemental Fig. 2). It should be noted that single cell cultures of DCs did not produce IFN- γ upon infection (data not shown).



These data indicate that DCs are required to induce IFN- γ production by NK cells in the context of encapsulated streptococcal infections. In general, and similarly to that observed *ex vivo*, type III GBS showed higher capacity to induce *in vitro* IFN- γ production by NK cells in co-culture than type 2 *S. suis* (Supplemental Fig. 2).

Fig. 4. Cytokine profiles of DC-NK cell co-cultures in contact with GBS or *S. suis*.

DCs and NK cells (at a ratio of 1:3) were stimulated with type III GBS wild-type strain COH-1 or type 2 *S. suis* wild-type strain P1/7 (2.5×10^5 CFU, initial DC-bacteria MOI:1). After a bacterium-cell contact incubation time of 2 h or 6 h, chloramphenicol (for GBS) or gentamycin (for *S. suis*)

was added to prevent cell toxicity, respectively. Supernatants were collected at 14 h of incubation, and IFN- γ (**A-B**), TNF- α (**C**), IL-12p70 (**D**) and CXCL9 (**E**) levels were measured by ELISA. Non-stimulated cells (medium alone) served as negative (C-) controls. In addition, single-DC or NK cell cultures were also included as controls. Data represent mean values (in ng/ml) \pm SEMs of eight distinct experiments. ** $P < 0.01$, indicates statistically significant differences between single cell cultures vs co-cultures. § $P < 0.01$, indicates statistically significant differences between GBS-infected cells vs *S. suis*-infected cells. Unless otherwise indicated NKs states for culture-expanded splenic NK cells.

NK cells provide a positive feedback loop for DC activation which differs between GBS and S. suis

Because the crosstalk between DCs and NK cells is bidirectional (24, 30, 31, 73, 74), it was important to determine whether the production of IFN- γ influences the magnitude and profile of cytokine secretion by DC-NK cell co-cultures. Type III GBS induced a high production of TNF- α by DCs and this production was unchanged in DC-NK cell co-cultures (Fig. 4C). Thus, and similarly to that observed *ex vivo* (Fig. 2A), NK cells did not produce TNF- α and did not influence the production of this cytokine by infected DCs. A similar pattern was observed for type 2 *S. suis*-infected co-cultures; however, levels of TNF- α secretion by DCs were markedly lower than those observed for type III GBS (Fig. 4C). Similar results were obtained when the pro-inflammatory cytokine IL-6 was evaluated with either GBS or *S. suis* (data not shown). In contrast, production of IL-12p70 in infected DC-NK cell co-cultures was significantly higher than infected-DC single cultures for both pathogens ($P < 0.01$; Fig. 4D). Yet, type 2 *S. suis* induced lower levels of IL-12p70 by either DCs or DC-NK cell co-cultures than those obtained upon infection with type III GBS ($P < 0.01$; Fig. 4D). Finally, the production of CXCL9 in DC-NK cell co-cultures was evaluated as it is a chemokine known to be induced by IFN- γ (75-77). Type III GBS failed to induce this CXCL9 production by DCs in single cultures, but its production was markedly increased in co-cultures ($P < 0.01$; Fig. 4E), indicating an important role of NK-derived IFN- γ in induction of CXCL9 production. In contrast to GBS, neither DC single cultures nor DC-NK cell co-cultures produced significant levels of CXCL9 in contact with type 2 *S. suis* when compared to respective non-infected cultures (Fig. 4E), suggesting that the synergistic effect between DCs and NK cells differs in magnitude and/or profile upon the streptococcal species.

Cell-cell contact and soluble factors are important in the DC-NK cell crosstalk

To further characterize the interactions between DCs and NK cells during encapsulated streptococcal infections, the requirement of cell-cell contact was evaluated using a Transwell® system. As shown in Fig. 5A, the absence of direct cell-cell contact resulted in significant inhibition of IFN- γ production by NK cells for either GBS or *S. suis*-infected co-cultures ($P < 0.01$). Despite this strong inhibition, IFN- γ production was still higher than that observed in respective non-infected controls ($P < 0.05$), indicating that part of this production is independent of cell-cell contact and thus probably mediated by soluble factors. Cell-cell contact was also markedly required for the synergistic effect on cytokine production observed in infected DC-NK cell co-cultures (Fig. 5B and C). Indeed, the increased production of IL-12p70 and CXCL9 in type III GBS-infected co-cultures was almost completely inhibited ($P < 0.01$), indicating that this synergistic effect mostly depends on cell-cell contact. Similarly, a marked but yet not complete inhibition was observed in the IL-12p70 production by *S. suis*-infected co-cultures when using a Transwell® insert (Fig. 5B).

To confirm that soluble factors from infected DCs might play a minor, but still significant, role in NK-derived IFN- γ production, NK cells alone were incubated with supernatants from either GBS or *S. suis*-infected DCs. Production of IFN- γ by NK cells was significantly higher after incubation with supernatants from infected DCs than that obtained with supernatants from non-infected DCs (Fig. 5D). This production was similar to the observed residual IFN- γ production in co-cultures containing a Transwell® insert (Fig. 5A).

Thus, for both GBS and *S. suis*, the IFN- γ production by NK cells and the synergistic effect on cytokine production by DC-NK cell co-cultures are principally dependant on cell-cell contact, yet a contribution of soluble factors to the IFN- γ production is observed.

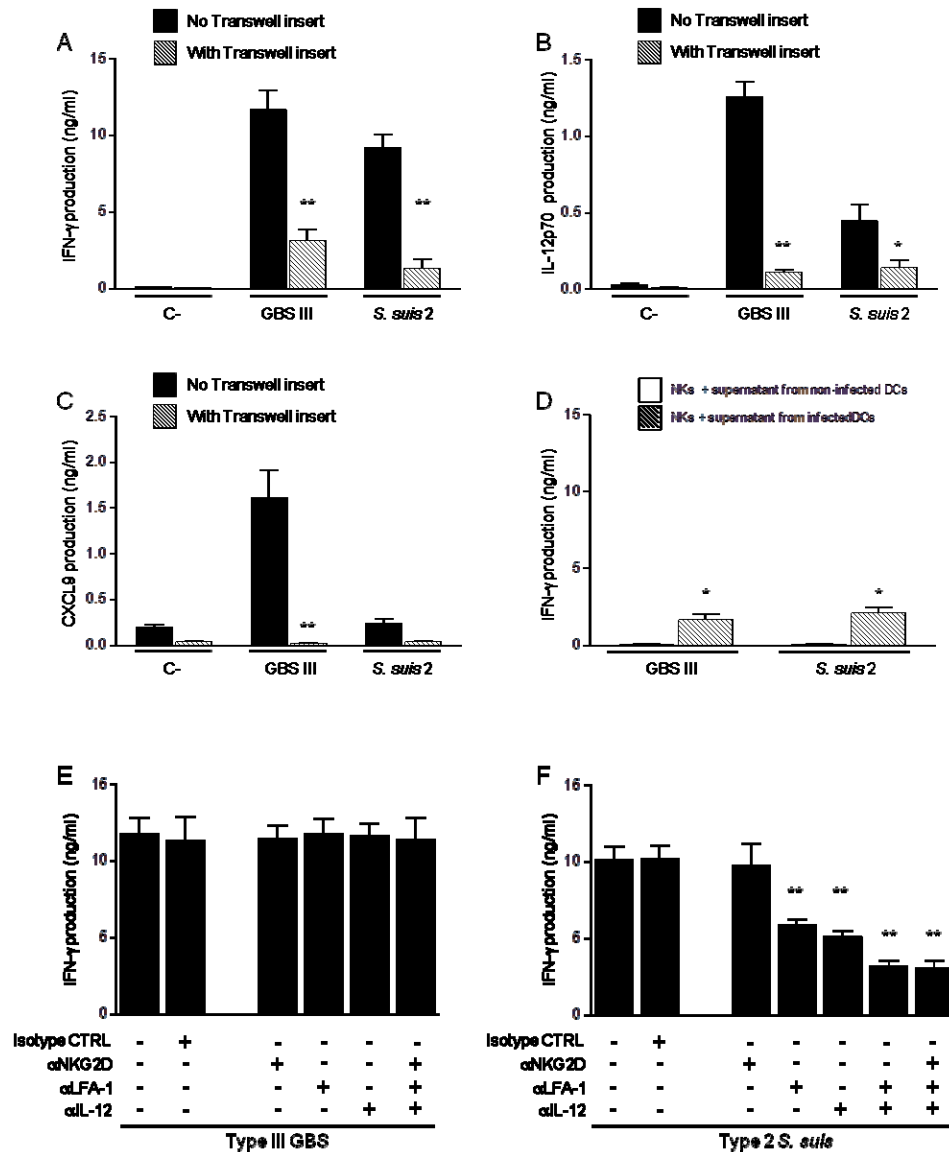


Fig. 5. Different mechanisms mediate DC-NK cell crosstalk during GBS or *S. suis* infections.

DCs and culture-expanded splenic NK cells were co-cultured (at a ratio 1:3) in the presence or not of a Transwell insert (**A-C**) or pre-incubated with neutralizing antibodies (anti-IL-12, 20 μ g/ml; anti-NKG2D, 10 μ g/ml; and/or anti-LFA-1, 10 μ g/ml) or with the isotype controls (CTRL) rat IgG2a and Armenian hamster IgG (**E-F**). Co-cultures were stimulated with type III GBS wild-type strain COH-1 or type 2 *S. suis* wild-type strain P1/7 (2.5×10^5 CFU, initial DC-bacteria MOI:1). After a bacterium-cell contact incubation time of 2 h or 6 h, chloramphenicol (for GBS) or gentamycin (for *S. suis*) was added to prevent cell toxicity, respectively. In (**D**) NK cells alone were incubated with supernatants from GBS or *S. suis*-infected DCs. After 14 h of incubation, IFN- γ (**A, D-F**), IL-12p70 (**B**) and CXCL9 (**C**) levels were measured by ELISA. Non-stimulated

cells (medium alone or supernatant from non-infected DCs) served as negative (C-) controls. Data represent mean values (in ng/ml) \pm SEMs of eight distinct experiments. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$ indicates statistically significant differences compared to respective non-treated controls in each graph.

The molecular components involved in the DC-NK cell crosstalk differ upon the streptococcal species

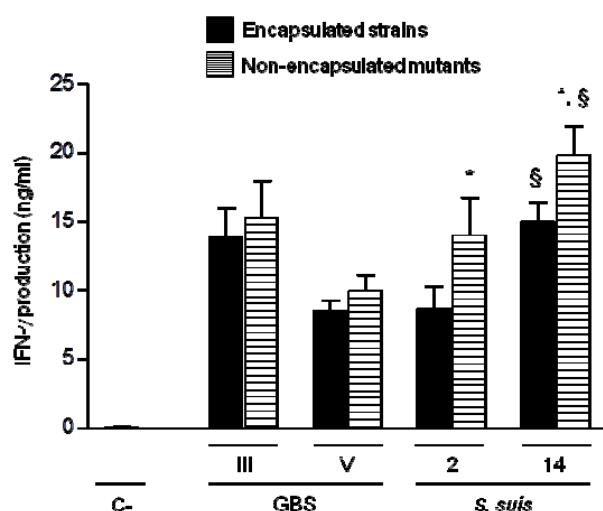
Because cell-cell contact is important in the IFN- γ production by NK cells in the presence of DCs, we were interested in characterizing the molecular components involved in this interaction. LFA-1 plays important roles in the immune system including cell adhesion, migration, cytokine production and proliferation of lymphocytes. LFA-1 binds, among others, to ICAM-1 that is expressed on APCs, such as DCs (78). The NKG2D-activating receptor is constitutively expressed on the surface of circulating and tissue-resident NK cells and other cytotoxic lymphocytes (79, 80). The recognition of NKG2D ligands (present on many cell types, including DCs) also induces production of several cytokines, including IFN- γ (81, 82). As LFA-1 and NKG2D receptors have previously been reported to play a role in the DC-NK crosstalk or in bacterial infections (36, 54, 57, 83), their contribution to NK cell-mediated IFN- γ production during GBS or *S. suis* infections was evaluated. When DC-NK cell co-cultures were pre-treated with neutralizing antibodies against LFA-1 or NKG2D, either alone or in combination, IFN- γ production was unaltered after type III GBS stimulation (Fig. 5E). Similarly, neutralization of NKG2D did not affect IFN- γ production by NK cells upon type 2 *S. suis* stimulation (Fig. 5F). However, and in contrast to that observed for GBS, neutralization of LFA-1 significantly reduced IFN- γ secretion in *S. suis*-infected co-cultures ($P < 0.01$).

It has been shown that IL-12 is required for IFN- γ production, and the effect of IL-12 is most eminent in combination with IL-18, for both NK and T cells (84, 85). Since IL-18 is not produced by GBS- or *S. suis*-infected DCs under our culture conditions (data not shown), we investigated more specifically the role of IL-12 in the IFN- γ production induced by these two pathogens. Anti-IL-12 blocking antibody did not affect IFN- γ production by NK cells in contact with type III GBS-infected DCs, while its production was significantly reduced in DC-NK cell co-cultures infected with type 2 *S. suis* (Fig. 5E-F). Combination of anti-LFA-1, anti-NKG2D or anti-IL-12 neutralizing antibodies, either in pairs or altogether, confirmed that

LFA-1 and IL-12 have a synergistic effect on *S. suis*-induced IFN- γ production by NK cells (Fig. 5F). Indeed a decrease of 70% in IFN- γ production was observed in co-cultures treated with a combination of anti-LFA-1 and anti-IL-12 neutralizing antibodies compared to non-treated controls ($P < 0.01$). Absence of effect on IFN- γ production by the isotype controls confirmed the specificity of the inhibition. In contrast, the combination of neutralizing antibodies against the three molecules did not affect IFN- γ production in GBS-infected DC-NK cell co-cultures (Fig. 5E).

S. suis CPS but not GBS CPS impairs NK cell activation

The CPS is an important virulence factor contributing to the pathogenesis of disease caused by GBS or *S. suis*. However, the presence of CPS differently modulates the interactions of these bacteria with immune cells (6, 11, 14, 16-22, 86). To dissect the impact



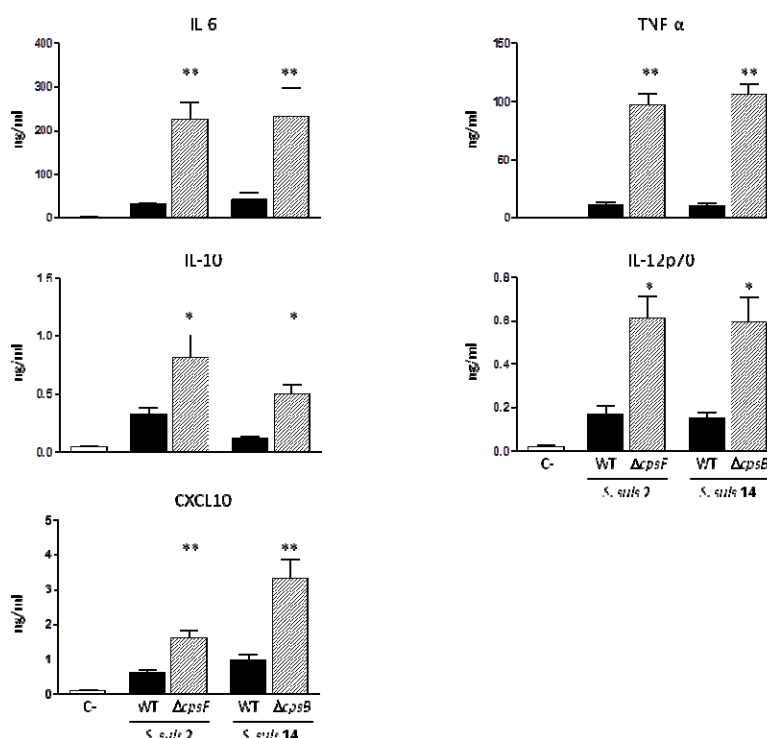
of bacterial CPS on NK cell activation, two different serotypes harbouring distinct CPS structures and their respective non-encapsulated mutants were evaluated for each bacterial species. NK cell production of IFN- γ induced by encapsulated type V GBS was slightly lower than that observed with type III GBS. Nevertheless, the presence of CPS did not significantly affect NK cell activation by either of GBS serotypes (Fig. 6).

Fig. 6. Role of bacterial capsular polysaccharide in the modulation of cytokine production by NK cells.

DC and NK cell co-cultures (at a ratio 1:3) were stimulated with type III or type V GBS wild-strains, type 2 or type 14 *S. suis* wild-type strains or their respective non-encapsulated mutant strains (2.5×10^5 CFU, initial DC-bacteria MOI:1). After a bacterium-cell contact incubation time of 2 h or 6 h, chloramphenicol (for GBS) or gentamycin (for *S. suis*) was added to prevent cell toxicity, respectively. Supernatants were collected at 14 h of incubation and IFN- γ levels were measured by ELISA. Non-stimulated cells (medium alone) served as negative (C-) controls. Data represent mean values (in ng/ml) \pm SEMs of five distinct experiments. * $P < 0.05$, indicates

statistically significant differences between wild-type strains and their respective non-encapsulated mutants. § $P < 0.01$, indicates statistically significant differences between type 2 *S. suis* and type 14 *S. suis* strains.

In the case of *S. suis*, type 14 *S. suis* induced higher levels of IFN- γ secretion by NK cells than type 2 *S. suis* ($P < 0.01$; Fig. 6). When non-encapsulated mutants were tested, both induced significantly higher levels of IFN- γ production than their respective wild-type strains ($P < 0.05$). In agreement with their enhanced capacity to stimulate IFN- γ release by NK cells, non-encapsulated mutants of either type 2 or type 14 *S. suis* induced higher production of several cytokines by single DC cultures than the wild-type strains (Supplemental Fig. 3). Albeit differences in IFN- γ levels induced by different serotypes, probably related to the intrinsic capacity of each strain to activate cells, the bacterial CPS effect on NK activation was species-dependent but serotype-independent.



Supplemental Fig. 3. Effect of bacterial CPS on cytokine release by DCs in response to *S. suis*.

DCs were stimulated with either type 2 or type 14 *S. suis* wild-type strains or their respective non-encapsulated (Δcps) mutants (2.5×10^5 CFU, initial MOI:1). After 6 h of DC-*S. suis* infection, gentamycin was added to the culture to prevent cell toxicity. Non-stimulated cells served as negative control (C-) for basal expression levels. Supernatants were harvested at 14 h of incubation and cytokine production quantified by ELISA. Data are expressed as mean \pm SEM (in ng/ml) from eight independent experiments. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$, indicate statistically significant differences between wild-type strains and their respective non-encapsulated mutants.

Discussion

Despite advances in understanding the pathogenesis of disease caused by encapsulated bacteria, more specifically on the interactions between these bacteria and cells of the innate immunity, such as DCs, macrophages and neutrophils, few works had focused on the importance of NK cells during GBS or *S. suis* infections. Furthermore, a convincing analysis at single cell level of the source(s) of IFN- γ in the early immune response to an acute infection with these bacterial pathogens is still missing. In the present work, we addressed for the first time the involvement of splenic NK cells in the innate immune response to GBS and *S. suis* and the role of DCs in initiating NK cell activation.

A critical role for IFN- γ in the defense against a variety of diseases, including extracellular bacterial infections, has been evidenced (25, 36, 87). IFN- γ is a representative and essential cytokine for protective cellular immunity and is also a key molecule for connecting innate and adaptive immune cells. Several lymphocyte subsets, including NK cells, NKT cells, and T cells are capable of producing IFN- γ . A protective role of IFN- γ was previously shown in type III and V GBS infections in mice (40) while limited information is available for the swine and zoonotic pathogen, *S. suis*.

In this study, during the acute phase of systemic GBS or *S. suis* infection, NK cells were identified as the main producers of IFN- γ . However, comparatively to GBS, this dominance disappears rapidly during *S. suis* infection. In fact, GBS infection results in a stronger boost of early IFN- γ production with concomitant higher activation of the innate immune cascade than *S. suis*. Lachance *et al.* recently reported that a hyper-virulent type 2 *S. suis* strain, responsible of a deadly human outbreak in China, has evolved to massively activate IFN- γ production leading to a rapid and lethal streptococcal toxic shock-like syndrome. *S. suis* European strains (like the one used in the present study) have been reported to be less virulent than the Chinese epidemic strain, and microarray analyses indicated lower induction of IFN- γ gene expression in European strain-infected mice than Chinese-strain infected counterparts (35). Our data confirm a weak IFN- γ response induced by a European-origin type 2 *S. suis* strain. Yet, the strain is able to induce clinical signs of sepsis, meningitis and death, suggesting that an inflammatory response is indeed induced,

probably involving other innate immune cells and cytokines. In this regard, TNF- α and CD69 expression was observed in splenic cells from *S. suis*-infected animals.

NK cells have been identified in several studies as the main early source of IFN- γ during infection by several bacterial pathogens, most of them intracellular organisms, including *Francisella tularensis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* and *Mycobacterium* species (24-29). Only few studies have addressed the role of NK cells during streptococcal infections. NK cells were reported to be the dominant source of IFN- γ in brains or lungs during pneumococcal meningitis or pneumonia, respectively (88, 89). The increased resistance to *Streptococcus pyogenes* infection observed in NK cell-depleted mice was associated with reduced levels of IFN- γ during the early phase of infection, suggesting a role of NK cells in exacerbating pathology (90). Other innate cellular sources of IFN- γ are NKT cells, which were shown in this study to be the second source of IFN- γ during acute systemic infections with GBS or *S. suis*. In agreement with these findings, a previous study reported that NKT cells recognize diacylglycerol-containing glycolipids from GBS. However, the same study reported that NKT cells fail in responding to glycolipids from *S. suis* serotype 1 *in vitro* (91). Albeit at low levels, our *in vivo* work shows that NKT cells are activated during type 2 *S. suis* infection. It has been proposed that NKT cells can be activated by cytokines, particularly IL-12, even in the absence of CD1d antigen presentation and TCR engagement (92). As *S. suis*-activated DCs produce IL-12, a certain level of cytokine-driven activation of NKT cells might occur during *S. suis* infection. Another possibility is that the strain used in this study, which belongs to serotype 2, does contain CD1d binding antigens.

Interestingly, for both, *S. suis* and GBS, NK cells do not seem to contribute to TNF- α production. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrated that NK cells secrete large amounts of TNF- α in response to non-hemolytic *Escherichia coli* infection (93), and TNF- α production by NK cells plays an important role in NK cell-mediated antibacterial host defense in an influenza virus and *Staphylococcus aureus* co-infection mouse model (94). GBS and *S. suis* have been reported to induce high levels of TNF- α by DCs, macrophages and other host cells, which indicates that these bacteria possess the capacity to induce this cytokine release (6, 11, 16, 18, 22, 23, 86, 95).

CD69 is a type II C-type lectin involved in lymphocyte migration and cytokine secretion (96). CD69 expression represents one of the earliest available indicators of leukocyte activation and its rapid induction occurs through transcriptional activation. During GBS or *S. suis* infection, the level of CD69 expression increase not only on total splenocytes but also on NK1.1+ cells. Few studies are available on CD69 expression by NK cells during *in vivo* bacterial infections, but up-regulation of this molecule have been shown on NK cells activated *in vitro* with purified bacterial pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (69, 70, 97, 98). Studies using non-infectious models suggest that CD69 up-regulation seems to prepare NK cells for further responses, such as cytotoxicity or cytokine production (99, 100). Interestingly, in our bacterial infection models, we also observed a decrease in NK1.1+ cells in the spleens, which might suggests NK cell trafficking upon activation towards the sites of bacterial infection. On the other hand, NK cell death induced by *E. coli* infection has been reported (93). More investigations are necessary to understand NK cell lifespan and trafficking during GBS or *S. suis* infections.

Some studies have addressed the direct interaction of pathogens with NK cells. It is well known that macrophages and DCs recognize PAMPs (101). Increasing evidence suggests that, in some cases, direct interaction of NK cells with pathogen-derived ligands may also results in NK cell activation (24). For example, it has been demonstrated that NK cells directly recognize PAMPs expressed on bacterial surfaces, such as OmpA of *Klebsiella pneumonia* and lipoteichoic acid from *S. aureus* via TLR2, as well as flagellin of *E. coli* by TLR5. This evidence demonstrates that NK cells are responsive to TLR ligands, and that such recognition triggers IFN- γ and CD69 expression among other pathways (33, 97, 98). Direct binding of *Mycobacterium bovis* and *Pseudomonas aeruginosa* cell wall-derived proteins to NKp44 receptor, has also been reported (66, 67). GBS and *S. suis* have been shown to possess ligands for TLR2 and to activate innate immune cells via several TLRs (86, 102). In our study, GBS or *S. suis* failed to directly activate NK cells *in vitro*. Thus direct contact between live bacteria and NK cells or soluble components from encapsulated streptococci do not seem enough to trigger NK cell activation.

Indirect activation of NK cells by bacteria is increasingly studied and better described. The requirement of accessory cells for NK cell activation during infection has been documented (103). DCs and macrophages have been identified as key partners for NK cells, particularly because they are a major source of IL-12, and can also produce IL-15,

IL-18 and IFN- α (25, 103) (55, 73, 104). In GBS infection, for example, it was shown that IL-12 and IL-18 mediate their therapeutic effects by increasing IFN- γ production by responding immune cells (37-39). An early study showed that peritoneal macrophages and bone marrow-derived cells from severe combined immunodeficiency mice cultured separately with type III GBS did not produce IFN- γ , whereas co-cultures did produce IFN- γ . These cultures contained around 40% of NK.1.1+ cells (44). By using a more refined co-culture system of DCs and NK cells, we demonstrated that GBS or *S. suis*-infected DCs are important inducers of IFN- γ production by NK cells. DCs, in contact with GBS or *S. suis*, produce several cytokines and chemokines, notably IL-12 (16-18, 20, 86) and thus have the potential to activate NK cells. Only few studies have addressed the modulation of the DC-NK cell crosstalk by streptococci. Elhaik-Goldman et al. showed that *S. pneumoniae*-infected DCs can activate NK cells to produce IFN- γ *in vitro* (34). Recently, it has been shown that DC-NK cell crosstalk was primarily responsible for IFN- γ release induced by *Streptococcus salivarius* *in vitro* (36). Cell contact and cytokine release into the synapse between DCs and NK cells may enhance the exchange and activity of soluble factors (32). Data from this study demonstrated that cell-cell contact between DCs and NK cells is critical for the IFN- γ production in response to GBS or *S. suis*. Direct contact between NK cells and DCs is required in the context of *L. monocytogenes* infection, although the contact-dependent signals have not been characterized (55). Separation of human NK cells and DCs by a porous membrane during the culture in presence of LPS completely abrogated the induction of cytotoxic activity (105). Interestingly, in the context of *S. suis* infection, the contact dependency was in part mediated by LFA-1. Yet, this mechanism may not be generalized to all streptococcal species as GBS and *S. salivarius* (36) activation of DC-NK cell co-cultures is not dependent on LFA-1. In addition to LFA-1, it has been shown that IFN- γ production by NK cells is dependent on NKG2D receptor during *Pseudomonas aeruginosa* infection (106). In this study, we did not find evidence of direct involvement of NKG2D in the DC-NK cell synapse after infection with either GBS or *S. suis*. Similarly, NKG2D does not modulate the interactions between NK cells and macrophages in response to *Salmonella* infection (107) or the release of IFN- γ in *S. salivarius*-infected DC-NK co-cultures (36). Besides cell-cell contact, soluble factors also contribute to NK cell activation when co-cultured with APCs. The contribution of soluble factors in GBS or *S. suis*-infected co-cultures was minor, yet significant. Soluble factors barely participate in DC-mediated NK activation by lipoproteins from *S. aureus* while the IFN- γ response is altered when both cell types are separated (108).

IL-12 was identified as one of the soluble mediators required for an optimal IFN- γ production by NK cells in the context of *S. suis* infection. Consistent with our findings, IL-12 is required for NK cell activation in response to *L. monocytogenes*-infected DCs (55) or *Salmonella*-infected macrophages (107). In contrast, IFN- γ production by NK cells in contact with GBS-infected DCs is not affected by the neutralization of IL-12. It can be suggested that GBS-infected DCs, unlike *S. suis*-infected DCs, stimulate NK cells via several cytokines or redundant pathways. In this regard, IL-18 and/or IL-15 have been identified as contributing soluble factors for NK activation in bacterial infected co-cultures (55, 107). Costa *et al.* showed that DCs in contact with type III GBS are able to produce IL-18 (109); however, IL-18 levels were undetectable in our GBS-infected DC-NK co-cultures. To date, no studies reported IL-15 production by GBS-infected DCs. As type I IFN can also induce IFN- γ production by NK cells (110), IFN- β production by GBS-infected DCs might contribute to NK activation in GBS infected co-cultures (40).

It was further showed that NK cell activation had a synergistic effect in inducing cytokines and chemokines production by DCs in response to GBS or *S. suis*, notably by the increasing production of IL-12 mainly in a cell-cell contact dependent manner. DCs and NK cells are known to help each other to acquire their complete function. DCs promote the priming and development of NK cells, in turn; activated NK cells induce DCs maturation and cytokine production (31, 77, 111, 112). Following cell-cell contact with NK cells, type III GBS-infected DCs are responsible for the production of the chemokine CXCL9. NK cells are a source of various chemokines, like CXCL10 and CCL3, but not CXCL9 (24), and bone marrow-derived DCs alone in contact with type III GBS are unable to produce CXCL9 (18). Thus, production of this chemokine depends on a synergistic effect between DCs and NKs. Yet, this synergy is not observed in *S. suis*-infected co-cultures, suggesting once again that modulation of the DC-NK cell crosstalk varies upon the pathogen. Resting human NK cells have been found to migrate in response to known ligands for CXCR3, like CXCL9 and CXCL10 (77, 113). It might be suggested that activated NK cells can modulate DCs to produce specific chemokines to attract other cells.

Both, GBS and *S. suis* possess a thick CPS that was previously shown to differentially modulate these two streptococcal species interactions with DCs (16-18, 20-23, 86). In agreement with these previous studies, GBS CPS does not seem to impair DC-NK cell crosstalk, and confirm the fact that this bacterial CPS is not acting as a physical barrier

impairing PAMP ligation to activating receptors on DCs. In marked contrast, *S. suis* CPS readily acts as a cloaking factor and impairs optimal activation of the DC-NK cell synapse. This CPS immuno-modulatory effect might explain, at least in part, the lower inflammatory cascade induced *in vivo* by a *S. suis* infection when compared to GBS-infected mice. In spite of biochemical differences in CPS structures, similar behaviors were observed when other GBS or *S. suis* serotypes were evaluated. Type III or type V GBS CPS does not significantly impair DC activation (22) and consequently the DC-NK crosstalk, whereas both, type 2 and type 14 *S. suis* CPSs hinder not only optimal DC functions (16, 17, 23, 86) but also the immunological synapse between these cells and NK cells. These findings suggest that the impact of bacterial CPSs on NK cell activation varies upon the streptococcal species but does not seem to depend on the serotype.

Our results strongly suggest that NK cells and IFN- γ play an active role in the orchestration of the innate immune response during the acute phase of encapsulated streptococcal infections. Based on our findings, we propose a model where DCs first recognize GBS or *S. suis* and produce several cytokines which sensitize IFN- γ induction in NK cells. In return, the NK cell activation leads optimal activation of DCs, mostly by increasing IL-12 production. The close contact between these cells is essential for a fully NK cell activation; however GBS and *S. suis* differently modulate this interaction. Overall this study suggests that the molecular pathways governing the DC-NK cell immunological synapse differ upon the pathogen and should not be generalized when studying bacterial infections.

Acknowledgements

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through grant to MS (#342150). PL is the recipient of a Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies PhD Award.

References

1. **Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schrag SJ, Zaidi AK, et al.** 2012. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet* **379**:547-556.
2. **Edwards MS, Baker CJ.** 2005. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* **41**:839-847.
3. **Koenig JM, Keenan WJ.** 2009. Group B *Streptococcus* and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr Clin North Am* **56**:689-708.
4. **Le Doare K, Heath PT.** 2013. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine* **31** D7-12.
5. **Skoff TH, Farley MM, Petit S, Craig AS, Schaffner W, et al.** 2009. Increasing burden of invasive Group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. *Clin Infect Dis* **49**:85-92.
6. **Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M.** 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol* **7**:259-279.
7. **Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M.** 2010. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol* **5**:371-391.
8. **Gottschalk M, Segura M, Xu J.** 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim Health Res Rev* **8**:29-45.
9. **Kerdsin A, Oishi K, Sripakdee S, Boonkerd N, Polwichai P, et al.** 2009. Clonal dissemination of human isolates of *Streptococcus suis* serotype 14 in Thailand. *J Med Microbiol* **58**:1508-1513.
10. **Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, et al.** 2005. Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides. *Infect Immun* **73**:3096-3103.
11. **Maisey HC, Doran KS, Nizet V.** 2008. Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert Rev Mol Med* **10**:e27.
12. **Van Calsteren MR, Gagnon F, Calzas C, Goyette-Desjardins G, Okura M, et al.** 2013. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 14 capsular polysaccharide. *Biochem Cell Biol* **91**:49-58.
13. **Van Calsteren MR, Gagnon F, Lacouture S, Fittipaldi N, Gottschalk M.** 2010. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide. *Biochem Cell Biol* **88**:513-525.
14. **Segura M.** 2012. Fisher scientific award lecture - the capsular polysaccharides of Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* differently modulate bacterial interactions with dendritic cells. *Can J Microbiol* **58**:249-260.
15. **Segura MA, Cleroux P, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**:189-195.
16. **Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, et al.** 2011. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis* **204**:919-929.
17. **Lecours MP, Segura M, Lachance C, Mussa T, Surprenant C, et al.** 2011. Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. *Vet Res* **42**:72.

18. **Lemire P, Houde M, Lecours MP, Fittipaldi N, Segura M.** 2012. Role of capsular polysaccharide in Group B Streptococcus interactions with dendritic cells. *Microbes Infect* **14**:1064-1076.
19. **Calzas C, Goyette-Desjardins G, Lemire P, Gagnon F, Lachance C, et al.** 2013. Group B Streptococcus and Streptococcus suis capsular polysaccharides induce chemokine production by dendritic cells via Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent and -independent pathways. *Infect Immun* **81**:3106-3118.
20. **Lemire P, Houde M, Segura M.** 2012. Encapsulated group B Streptococcus modulates dendritic cell functions via lipid rafts and clathrin-mediated endocytosis. *Cell Microbiol* **14**:1707-1719.
21. **Roy D, Auger JP, Segura M, Fittipaldi N, Takamatsu D, et al.** 2014. Role of the capsular polysaccharide as a virulence factor for *Streptococcus suis* serotype 14. *Can J Vet Res* **Submitted**.
22. **Lemire P, Roy D, Fittipaldi N, Okura M, Takamatsu D, et al.** 2014. TLR- but not NOD2-signalling pathways are involved in dendritic cell activation by Group B *Streptococcus* serotypes III and V. *PLoS One* **Submitted**.
23. **Meijerink M, Ferrando ML, Lammers G, Taverne N, Smith HE, et al.** 2012. Immunomodulatory effects of *Streptococcus suis* capsule type on human dendritic cell responses, phagocytosis and intracellular survival. *PLoS ONE* **7**:e35849.
24. **Souza-Fonseca-Guimaraes F, Adib-Conquy M, Cavaillon JM.** 2012. Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: angels or devils? *Mol Med* **18**:270-285.
25. **Adib-Conquy M, Scott-Algara D, Cavaillon JM, Souza-Fonseca-Guimaraes F.** 2014. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunol Cell Biol* **92**:256-262.
26. **Lopez MC, Duckett NS, Baron SD, Metzger DW.** 2004. Early activation of NK cells after lung infection with the intracellular bacterium, *Francisella tularensis* LVS. *Cell Immunol* **232**:75-85.
27. **Thale C, Kiderlen AF.** 2005. Sources of interferon-gamma in early immune response to *Listeria monocytogenes*. *Immunobiology* **210**:673-683.
28. **Feng CG, Kaviratne M, Rothfuchs AG, Cheever A, Hieny S, et al.** 2006. NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **177**:7086-7093.
29. **Kupz A, Curtiss R, 3rd, Bedoui S, Strugnell RA.** 2014. In vivo IFN-gamma secretion by NK cells in response to *Salmonella typhimurium* requires NLRC4 inflammasomes. *PLoS ONE* **9**:e97418.
30. **Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, et al.** 2006. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev* **214**:219-228.
31. **Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E.** 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* **106**:2252-2258.
32. **Borg C, Jalil A, Laderach D, Maruyama K, Wakasugi H, et al.** 2004. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* **104**:3267-3275.
33. **Chalifour A, Jeannin P, Gauchat JF, Blaecke A, Malissard M, et al.** 2004. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* **104**:1778-1783.
34. **Elhaik-Goldman S, Kafka D, Yossef R, Hadad U, Elkabets M, et al.** 2011. The natural cytotoxicity receptor 1 contribution to early clearance of *Streptococcus pneumoniae* and to natural killer-macrophage cross talk. *PLoS One* **6**:e23472.

35. **Lachance C, Gottschalk M, Gerber PP, Lemire P, Xu J, et al.** 2013. Exacerbated type II interferon response drives hypervirulence and toxic shock by an emergent epidemic strain of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **81**:1928-1939.
36. **Bouwer AL, Saunderson SC, Dunn AC, Lester KL, Crowley LR, et al.** 2013. Rapid interferon-gamma release from natural killer cells induced by a streptococcal commensal. *J Interferon Cytokine Res* **33**:459-466.
37. **Cusumano V, Mancuso G, Genovese F, Delfino D, Beninati C, et al.** 1996. Role of gamma interferon in a neonatal mouse model of Group B streptococcal disease. *Infect Immun* **64**:2941-2944.
38. **Cusumano V, Midiri A, Cusumano VV, Bellantoni A, De Sossi G, et al.** 2004. Interleukin-18 is an essential element in host resistance to experimental Group B streptococcal disease in neonates. *Infect Immun* **72**:295-300.
39. **Mancuso G, Cusumano V, Genovese F, Gambuzza M, Beninati C, et al.** 1997. Role of interleukin 12 in experimental neonatal sepsis caused by Group B streptococci. *Infect Immun* **65**:3731-3735.
40. **Mancuso G, Midiri A, Biondo C, Beninati C, Zummo S, et al.** 2007. Type I IFN signaling is crucial for host resistance against different species of pathogenic bacteria. *J Immunol* **178**:3126-3133.
41. **Lewis DB, Larsen A, Wilson CB.** 1986. Reduced interferon-gamma mRNA levels in human neonates. Evidence for an intrinsic T cell deficiency independent of other genes involved in T cell activation. *J Exp Med* **163**:1018-10123.
42. **Wilson CB.** 1986. Immunologic basis for increased susceptibility of the neonate to infection. *J Pediatr* **108**:1-12.
43. **Ye C, Zheng H, Zhang J, Jing H, Wang L, et al.** 2009. Clinical, experimental, and genomic differences between intermediately pathogenic, highly pathogenic, and epidemic *Streptococcus suis*. *J Infect Dis* **199**:97-107.
44. **Derrico CA, Goodrum KJ.** 1996. Interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha mediate innate production of gamma interferon by Group B *Streptococcus*-treated splenocytes of severe combined immunodeficiency mice. *Infect Immun* **64**:1314-1320.
45. **Lemire P, Calzas C, Segura M.** 2013. The NOD2 receptor does not play a major role in the pathogenesis of Group B *Streptococcus* in mice. *Microb Pathog* **65**:41-47.
46. **Chaffin DO, Mentele LM, Rubens CE.** 2005. Sialylation of group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression. *J Bacteriol* **187**:4615-4626.
47. **Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, et al.** 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:13950-13955.
48. **Slater JD, Allen AG, May JP, Bolitho S, Lindsay H, et al.** 2003. Mutagenesis of *Streptococcus equi* and *Streptococcus suis* by transposon Tn917. *Vet Microbiol* **93**:197-206.
49. **Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR, Henrichsen J.** 1989. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* **27**:2633-2636.
50. **Segura M, Su Z, Piccirillo C, Stevenson MM.** 2007. Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression. *Eur J Immunol* **37**:1887-1904.
51. **Yea SS, So L, Mallya S, Lee J, Rajasekaran K, et al.** 2014. Effects of novel isoform-selective phosphoinositide 3-kinase inhibitors on natural killer cell function. *PLoS One* **9**:e99486.

52. **Sanabria MX, Vargas-Inchaustegui DA, Xin L, Soong L.** 2008. Role of natural killer cells in modulating dendritic cell responses to *Leishmania amazonensis* infection. *Infect Immun* **76**:5100-5109.
53. **Pontiroli F, Dussurget O, Zanoni I, Urbano M, Beretta O, et al.** 2012. The timing of IFN β production affects early innate responses to *Listeria monocytogenes* and determines the overall outcome of lethal infection. *PLoS One* **7**:e43455.
54. **Jiao L, Gao X, Joyee AG, Zhao L, Qiu H, et al.** 2011. NK cells promote type 1 T cell immunity through modulating the function of dendritic cells during intracellular bacterial infection. *J Immunol* **187**:401-411.
55. **Humann J, Lenz LL.** 2010. Activation of naive NK cells in response to *Listeria monocytogenes* requires IL-18 and contact with infected dendritic cells. *J Immunol* **184**:5172-5178.
56. **Martinez J, Huang X, Yang Y.** 2010. Direct TLR2 signaling is critical for NK cell activation and function in response to vaccinia viral infection. *PLoS Pathog* **6**:e1000811.
57. **Guan H, Moretto M, Bzik DJ, Gigley J, Khan IA.** 2007. NK cells enhance dendritic cell response against parasite antigens via NKG2D pathway. *J Immunol* **179**:590-596.
58. **Klezovich-Benard M, Corre JP, Jusforgues-Saklani H, Fiole D, Burjek N, et al.** 2012. Mechanisms of NK cell-macrophage *Bacillus anthracis* crosstalk: a balance between stimulation by spores and differential disruption by toxins. *PLoS Pathog* **8**:e1002481.
59. **Dominguez-Punaro Mde L, Segura M, Radzioch D, Rivest S, Gottschalk M.** 2008. Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. *Infect Immun* **76**:3901-3910.
60. **Lachance C, Segura M, Gerber PP, Xu J, Gottschalk M.** 2013. Toll-like receptor 2-independent host innate immune response against an epidemic strain of *Streptococcus suis* that causes a toxic shock-like syndrome in humans. *PLoS ONE* **8**:e65031.
61. **Teti G, Mancuso G, Tomasello F.** 1993. Cytokine appearance and effects of anti-tumor necrosis factor alpha antibodies in a neonatal rat model of Group B streptococcal infection. *Infect Immun* **61**:227-235.
62. **Clarke D, Lecours MP, Lemire P, Galbas T, Thibodeau J, et al.** 2014. Group B *Streptococcus* induces a robust IFN- γ response by CD4 $^{+}$ T cells in an *in vitro* and *in vivo* model. *Infect Immun* **Submitted**.
63. **Lecours MP, Clarke D, Lemire P, Letendre C, Galbas T, et al.** 2014. Immune-responsiveness of CD4 $^{+}$ T cells during *Streptococcus suis* serotype 2 infection. *J Immunol* **Submitted**.
64. **Venet F, Davin F, Guignant C, Larue A, Cazalis MA, et al.** 2010. Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock* **34**:358-363.
65. **Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, et al.** 2003. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* **130**:65-74.
66. **Esin S, Batoni G, Counoupas C, Stringaro A, Brancatisano FL, et al.** 2008. Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect Immun* **76**:1719-1727.
67. **Marcenaro E, Ferranti B, Falco M, Moretta L, Moretta A.** 2008. Human NK cells directly recognize *Mycobacterium bovis* via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC. *Int Immunol* **20**:1155-1167.

68. **Marr KJ, Jones GJ, Zheng C, Huston SM, Timm-McCann M, et al.** 2009. *Cryptococcus neoformans* directly stimulates perforin production and rearms NK cells for enhanced anticryptococcal microbicidal activity. *Infect Immun* **77**:2436-2446.
69. **Mian MF, Lauzon NM, Andrews DW, Lichty BD, Ashkar AA.** 2010. FimH can directly activate human and murine natural killer cells via TLR4. *Mol Ther* **18**:1379-1388.
70. **Schmidt KN, Leung B, Kwong M, Zarembek KA, Satyal S, et al.** 2004. APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *J Immunol* **172**:138-143.
71. **Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Vitale M, et al.** 2004. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:10116-10121.
72. **Yun CH, Lundgren A, Azem J, Sjoling A, Holmgren J, et al.** 2005. Natural killer cells and *Helicobacter pylori* infection: bacterial antigens and interleukin-12 act synergistically to induce gamma interferon production. *Infect Immun* **73**:1482-1490.
73. **Horowitz A, Stegmann KA, Riley EM.** 2011. Activation of natural killer cells during microbial infections. *Front Immunol* **2**:88.
74. **Barreira da Silva R, Munz C.** 2011. Natural killer cell activation by dendritic cells: balancing inhibitory and activating signals. *Cell Mol Life Sci* **68**:3505-3518.
75. **Farber JM.** 1997. MIG and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* **61**:246-257.
76. **Park MK, Amichay D, Love P, Wick E, Liao F, et al.** 2002. The CXC chemokine murine monokine induced by IFN-gamma (CXC chemokine ligand 9) is made by APCs, targets lymphocytes including activated B cells, and supports antibody responses to a bacterial pathogen *in vivo*. *J Immunol* **169**:1433-1443.
77. **Robertson MJ.** 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* **71**:173-183.
78. **Binnerts ME, van Kooyk Y.** 1999. How LFA-1 binds to different ligands. *Immunol Today* **20**:240-245.
79. **Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, et al.** 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* **285**:727-729.
80. **Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, et al.** 2002. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* **17**:19-29.
81. **Hou X, Zhou R, Wei H, Sun R, Tian Z.** 2009. NKG2D-retinoic acid early inducible-1 recognition between natural killer cells and Kupffer cells in a novel murine natural killer cell-dependent fulminant hepatitis. *Hepatology* **49**:940-949.
82. **Zhou Z, Zhang C, Zhang J, Tian Z.** 2012. Macrophages help NK cells to attack tumor cells by stimulatory NKG2D ligand but protect themselves from NK killing by inhibitory ligand Qa-1. *PLoS One* **7**:e36928.
83. **Wesselkamper SC, Eppert BL, Motz GT, Lau GW, Hassett DJ, et al.** 2008. NKG2D is critical for NK cell activation in host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection. *J Immunol* **181**:5481-5489.
84. **Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H.** 2001. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**:53-72.
85. **Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K.** 1998. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr Opin Immunol* **10**:259-264.

86. **Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M.** 2012. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. PLoS ONE 7:e44746.
87. **Chesler DA, Reiss CS.** 2002. The role of IFN-gamma in immune responses to viral infections of the central nervous system. Cytokine Growth Factor Rev 13:441-454.
88. **Mitchell AJ, Yau B, McQuillan JA, Ball HJ, Too LK, et al.** 2012. Inflammasome-dependent IFN-gamma drives pathogenesis in *Streptococcus pneumoniae* meningitis. J Immunol 189:4970-4880.
89. **McNeela EA, Burke A, Neill DR, Baxter C, Fernandes VE, et al.** 2010. Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. PLoS Pathog 6:e1001191.
90. **Goldmann O, Chhatwal GS, Medina E.** 2005. Contribution of natural killer cells to the pathogenesis of septic shock induced by *Streptococcus pyogenes* in mice. J Infect Dis 191:1280-1286.
91. **Kinjo Y, Illarionov P, Vela JL, Pei B, Girardi E, et al.** 2011. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. Nat Immunol 12:966-974.
92. **Brigl M, Tatituri RV, Watts GF, Bhowruth V, Leadbetter EA, et al.** 2011. Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. J Exp Med 208:1163-1177.
93. **Gur C, Copenhagen-Glazer S, Rosenberg S, Yamin R, Enk J, et al.** 2013. Natural killer cell-mediated host defense against uropathogenic *E. coli* is counteracted by bacterial hemolysinA-dependent killing of NK cells. Cell Host Microbe 14:664-674.
94. **Small CL, Shaler CR, McCormick S, Jeyanathan M, Damjanovic D, et al.** 2010. Influenza infection leads to increased susceptibility to subsequent bacterial superinfection by impairing NK cell responses in the lung. J Immunol 184:2048-2056.
95. **Ulett GC, Adderson EE.** 2005. Nitric oxide is a key determinant of Group B *Streptococcus*-induced murine macrophage apoptosis. J Infect Dis 191:1761-1770.
96. **Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR.** 1994. The activation antigen CD69. Stem Cells 12:456-465.
97. **Millard AL, Spirig R, Mueller NJ, Seebach JD, Rieben R.** 2010. Inhibition of direct and indirect TLR-mediated activation of human NK cells by low molecular weight dextran sulfate. Mol Immunol 47:2349-2358.
98. **Tsujimoto H, Uchida T, Efron PA, Scumpia PO, Verma A, et al.** 2005. Flagellin enhances NK cell proliferation and activation directly and through dendritic cell-NK cell interactions. J Leukoc Biol 78:888-897.
99. **Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F.** 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. Trends Immunol 26:136-140.
100. **Clausen J, Vergeiner B, Enk M, Petzer AL, Gastl G, et al.** 2003. Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. Immunobiology 207:85-93.
101. **Mogensen TH.** 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. Clin Microbiol Rev 22:240-273.
102. **Wennekamp J, Henneke P.** 2008. Induction and termination of inflammatory signaling in group B streptococcal sepsis. Immunol Rev 225:114-127.
103. **Newman KC, Riley EM.** 2007. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. Nat Rev Immunol 7:279-291.
104. **Haller D, Serrant P, Granato D, Schiffrin EJ, Blum S.** 2002. Activation of human NK cells by staphylococci and lactobacilli requires cell contact-dependent costimulation by autologous monocytes. Clin Diagn Lab Immunol 9:649-657.

105. **Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, et al.** 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* **195**:327-333.
106. **Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, Zhang S, Chen Y, et al.** 2006. The NKG2D-activating receptor mediates pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **74**:2578-2586.
107. **Lapaque N, Walzer T, Meresse S, Vivier E, Trowsdale J.** 2009. Interactions between human NK cells and macrophages in response to *Salmonella* infection. *J Immunol* **182**:4339-4348.
108. **Azuma M, Sawahata R, Akao Y, Ebihara T, Yamazaki S, et al.** 2010. The peptide sequence of diacyl lipopeptides determines dendritic cell TLR2-mediated NK activation. *PLoS ONE* **5**:e12550.
109. **Costa A, Gupta R, Signorino G, Malara A, Cardile F, et al.** 2012. Activation of the NLRP3 inflammasome by Group B streptococci. *J Immunol* **188**:1953-1960.
110. **Trinchieri G.** 2010. Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* **207**:2053-2063.
111. **Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Arico M, et al.** 2005. NK-dependent DC maturation is mediated by TNF-alpha and IFN-gamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* **106**:566-571.
112. **Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, et al.** 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses *in vivo*. *Nat Med* **5**:405-411.
113. **Maghazachi AA.** 2010. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **341**:37-58.

IV – DISCUSSION

Les infections causées par les bactéries encapsulées sont un sérieux problème en médecine vétérinaire et humaine. Pour ces pathogènes, tels que les streptocoques, la présence d'une capsule polysaccharidique (CPS) est importante dans la pathogénèse de l'infection. *Streptococcus* du Groupe B (GBS) et *Streptococcus suis* sont deux bactéries encapsulées qui provoquent des pathologies graves, y compris la méningite et la septicémie chez les animaux et/ou les humains. Les stratégies nationales mises en place ont permis de réduire l'incidence des infections néonatales à GBS, mais n'ont eu aucun impact majeur sur l'incidence chez les jeunes enfants. De plus, l'implantation de telles mesures reste plutôt difficile dans les pays en voie de développement, en particulier en Afrique (1). GBS est maintenant reconnu comme une cause émergente d'infections potentiellement mortelles chez les adultes, en particulier chez les adultes plus âgés (6, 7). *S. suis* constitue l'un des pathogènes majeurs chez le porc qui génère des pertes économiques importantes dans l'industrie porcine au Canada (2). Il est aussi un agent zoonotique en émergence chez les humains (4). Les épisodes d'infections par *S. suis* en Asie ont changé la perspective de la menace que ce pathogène représente pour la santé humaine. Il devient donc critique de mieux comprendre l'immuno-pathogénèse des maladies causées par ces bactéries pour davantage établir des stratégies efficaces. Depuis plus d'une décennie, beaucoup de recherches ont apporté une lumière sur les interactions entre GBS ou *S. suis* avec des phagocytes professionnels, tels que les macrophages et les neutrophiles. Cependant, les stratégies utilisées par GBS ou *S. suis* pour manipuler les fonctions des cellules dendritiques (DCs), connues comme les APCs les plus puissantes, n'étaient pas ou très peu étudiées au début de ce projet de recherche ainsi que les conséquences sous-jacentes à leur maturation et leur activation. Par exemple, seulement une étude d'infection *in vivo* était disponible et n'avait pas caractérisé les interactions entre les DCs et GBS (91). De plus, le rôle des cellules 'natural killer' (NK) ou les effets des DCs sur l'activation des cellules NK n'avaient pas été clairement définis dans le contexte d'infections par ces streptocoques. Depuis, plus d'une quinzaine d'articles ont décrits les interactions entre ces pathogènes et les DCs ainsi qu'avec des cellules de la réponse innée dont la moitié sont reliés à ce projet. Donc, cette thèse porte pour la première fois une étude plus complète des interactions entre GBS ou *S. suis* avec les DCs ainsi que l'importance de la CPS dans ces interactions. De plus, ce projet de recherche caractérise pour la première fois la participation des cellules NK dans le contexte d'infection par ces bactéries pathogènes.

La discussion des résultats obtenus dans le cadre cette thèse se divise en 3 principales sections :

- 1) Études des interactions entre des bactéries encapsulées et les DCs;
- 2) Caractérisation des fonctions des cellules NK dans la réponse innée face à des bactéries encapsulées;
- 3) Impact de la CPS dans l'immunité innée face à des streptocoques encapsulés.

1. Études des interactions entre des bactéries encapsulées et les DCs

1.1 Capacité d'internalisation de GBS et de *S. suis* par les DCs

Il est bien établi dans la littérature que GBS est capable d'envahir une grande variété de types cellulaires chez l'hôte, y compris les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les macrophages (5, 18, 32, 46, 94). Au début de ce projet de recherche, malgré l'importance des DCs dans l'établissement de la réponse immunitaire contre des pathogènes bactériens, les interactions directes entre GBS et les DCs n'étaient pas caractérisées, et encore moins la capacité phagocytaire des DCs contre ce pathogène. Dans le cas de *S. suis*, similairement, aucune étude n'avait adressé ces interactions.

Dans cette thèse, nous avons mis au point un très bon modèle *in vitro* pour l'étude des interactions entre GBS ou *S. suis* avec des DCs dérivées de la moelle osseuse chez la souris (bmDCs). La génération de DCs dérivées de la moelle osseuse (bmDCs) est une technique couramment utilisée dans le milieu scientifique. Elle permet de générer un grand nombre de DCs dites 'myéloïdes' et permet aussi d'étudier de nombreuses propriétés chez les DCs. Ces cellules sont considérées comme l'équivalent des DCs CD8 α - spléniques dites conventionnelles (365, 390). Cependant, il peut être difficile de placer ce type de DCs dans un contexte *in vivo*. En effet, les bmDCs sont représentatifs des DCs 'inflammatoires' dérivées de monocytes plutôt que de DCs résidentes (390). Néanmoins, la culture de bmDCs est un outil essentiel dans notre contexte d'étude.

Par diverses techniques (**ARTICLES I et V**), nous avons observé que les DCs internalisent grandement et efficacement GBS de types III et V encapsulés. Ces résultats sont

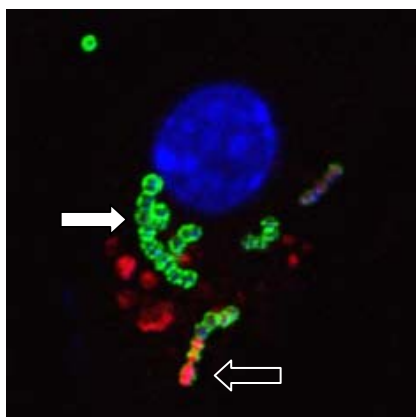
en accord avec des études précédentes qui utilisaient des lignées cellulaires de macrophages/monocytes, des macrophages provenant de cellules primaires ou de neutrophiles autant d'origine humaine que murine (18, 94, 351, 408, 493). De plus, nous avons observé que GBS des types III et V résistent bien à l'intérieur des DCs. À la même époque, Mancuso *et al.* avaient également rapporté des observations similaires et même que GBS de type III survivait plus longtemps dans les DCs comparativement aux macrophages chez la souris (494). Chaque type de leucocyte exécute sa tâche spécifique différemment. Par exemple, les neutrophiles et les monocytes ont une capacité bactéricide plus élevée que les DCs (495, 496). Nos résultats ont également démontré que, malgré que GBS de type V soit plus cytotoxique que GBS de type III envers les DCs, leur internalisation et leur survie intracellulaire sont similaires (**ARTICLE V**). Différents sérotypes de GBS, dont les sérotypes III et V, peuvent se retrouver à l'intérieur de vacuoles chez les macrophages (497). Chez les cellules épithéliales, des différences d'adhésion entre les sérotypes avaient été remarquées (80, 102, 498, 499) mais les différences dans le profil d'adhésion/invasion entre les sérotypes III et V n'étaient pas claires. Comme mentionné précédemment, les types III et V de GBS sont les sérotypes les plus impliqués dans les maladies invasives causées par ce pathogène (1, 40). Les différences dans la cytotoxicité cellulaire entre les types III et V chez les DCs peuvent s'expliquer par l'expression différentielle de facteurs de virulence dont, par exemple, GBS de type III qui sécrète des niveaux moins importants de la β -hémolysine/cytolysine (β -H/C) que le type V (102).

L'origine des DCs n'a pas d'effet sur leur capacité d'internalisation, du moins avec GBS de type III (**ARTICLE I**). Par contre, lorsque les taux de survie intracellulaire sont comparés, les DCs isolées de la rate possèdent une capacité bactéricide plus forte que les bmDCs contre GBS. La rate joue un rôle important dans l'immunité, notamment au niveau de l'immunité cellulaire où elle intervient particulièrement dans le contrôle des infections à bactéries encapsulées. Ceci démontre que l'origine cellulaire a une influence sur les interactions avec les bactéries pathogènes. Il serait intéressant dans le futur d'évaluer si les DCs d'origine humaine ont les mêmes capacités que les DCs d'origine murine.

S. suis de type 2 interagit lui aussi avec les bmDCs (**ANNEXE, ARTICLE VII**). Contrairement à GBS, il est faiblement phagocyté par les DCs. Le même constat a aussi été fait chez les DCs d'origine porcine et humaine (500, 501). Dans les études avec les DCs humaines, d'autres sérotypes avaient été comparés au type 2 et les sérotypes différent

considérablement dans leur capacité à être phagocytés. Par exemple, les types 4 et 9 sont davantage plus phagocytés que le type 2. Par contre, la capacité phagocytaire semble similaire pour *S. suis* de types 2 et 14 (501). Chez les DCs porcines, il a été démontré que *S. suis* de type 2 est rapidement éliminé à l'intérieur des cellules, ce qui laisse supposer une situation similaire chez les DCs d'origine murine (500). Des études antérieures avec les macrophages murins avaient également montré les mêmes observations (3, 18). Par contre, chez les DCs humaines, cette capacité rapide d'éliminer ce pathogène est partiellement modérée (501). Ces différences peuvent s'expliquer par l'utilisation d'une autre souche de *S. suis* de type 2, les doses de bactéries utilisées et/ou les différences dans la capacité bactéricide des DCs selon leur origine. Cependant, il est convenu de suggérer que les interactions intracellulaires entre les DCs et *S. suis* sont plutôt limitées.

Les observations avec *S. suis* laissent également suggérer que la capacité accrue du GBS à survivre dans les bmDCs, et au moins pour quelques heures dans les DCs de la rate, n'est pas simplement un reflet de la capacité réduite de ces APCs à éliminer les pathogènes, mais représente plutôt les propriétés intrinsèques de GBS qui lui permettent de résister ou de retarder les mécanismes bactéricides intracellulaires des DCs. De plus, les antigènes (les ADN bactériens entre autre) de GBS peuvent se retrouver dans deux compartiments intracellulaires distincts chez les bmDCs: GBS intact dans des phagosomes et GBS partiellement digéré dans des phagolysosomes (494). La capacité potentielle de GBS d'éviter ou de retarder la



maturation et/ou la fusion des phagosomes avec les lysosomes mérite davantage d'être étudiée dans le futur. Similairement à cette étude, nous avons aussi observé que GBS pouvait se retrouver dans différents compartiments cellulaires (données non-publiées, **Figure 32**).

Figure 32. GBS réside dans des compartiments acidifiés et non-acidifiés à l'intérieur des DCs.

Les cellules dendritiques de la moelle osseuse (bmDCs) sont traitées avec le LysoTracker (rouge) 2 heures avant l'infection avec la souche COH-1 de *Streptococcus* du Groupe B (GBS) (MOI:1) pour 1 heure. Les cellules sont fixées et marquées avec un sérum contre GBS (Alexa-Fluor 488, vert) et DAPI pour marquer le noyau ou l'ADN bactérien (bleu) Les flèches blanches et noires montrent les

phagosomes avec ou sans co-localisation avec le LysoTracker (couleur jaune due au chevauchement des couleurs rouge et verte), respectivement.

GBS et *S. suis* interagissent différemment avec les DCs. Le premier favorise son internalisation, alors que le second l'empêche ardemment. Étant donné la faible survie intracellulaire de *S. suis*, il est compréhensible pour cette bactérie d'éviter à tout prix son internalisation. Dans une étude antérieure comparative, ces deux pathogènes interagissaient différemment avec les macrophages murins (167). Nos résultats corrélaient donc avec ceux publiés précédemment. Il est clair que GBS et *S. suis* ont développé des stratégies différentes pour surmonter la réponse immunitaire de l'hôte, dont les DCs.

1.2 Caractérisation des mécanismes d'internalisation de GBS par les DCs

Dans cette section, étant donné la faible internalisation de *S. suis* de type 2 encapsulé chez les DCs, notre attention s'est davantage portée sur GBS de type III et les mécanismes reliés à sa grande internalisation chez les DCs (**ARTICLE II**). Les récentes données obtenues sur les mécanismes d'inhibition de la phagocytose par *S. suis* seront brièvement abordées à la section 3 de la discussion.

L'utilisation d'inhibiteurs de la voie d'endocytose médiée par la clathrine (CME) et des études de co-localisation par microscopie confocale démontrent que l'internalisation de GBS de type III par les DCs est partiellement dépendante de la clathrine et de la dynamine. Une étude antérieure avait suggéré un rôle partiel des 'clathrin-coated pits' (CCPs) dans l'internalisation de GBS de type III par les macrophages (94). L'importance de la CME dans les interactions entre les bactéries et les cellules de l'hôte a reçu beaucoup d'attention au cours des dernières années (502), en particulier chez *L. monocytogenes*. Plusieurs autres espèces bactériennes utilisent cette voie d'endocytose pour envahir des cellules non-phagocytaires (502, 503). Au meilleur de nos connaissances, les études portant sur le rôle de cette voie d'endocytose modulée par les bactéries chez les phagocytes professionnels et les DCs sont limitées ou inexistantes, respectivement (503). Contrairement à GBS, chez les macrophages, la phagocytose de *S. pyogenes* est indépendante de la clathrine (269).

Étant donné que la clathrine a un rôle partiel dans l'internalisation de GBS de type III chez les DCs, d'autres voies pourraient également être impliquées. Une étude antérieure a

indiqué que GBS exploite les radeaux lipidiques pour envahir les cellules épithéliales de l'endomètre humain (288). Nos résultats démontrent clairement l'importance des radeaux lipidiques dans l'internalisation de GBS par les DCs. Plusieurs études ont montré qu'une grande variété de pathogènes cible les radeaux lipidiques pour entrer dans les cellules de l'hôte (504, 505). En effet, cette voie d'entrée pourrait fournir une protection contre la dégradation lysosomale intracellulaire (505-507). Par exemple, *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli* et *L. monocytogenes* utilisent les radeaux lipidiques ou la présence de leurs récepteurs cibles dans ces radeaux pour faciliter leur entrée dans les cellules de l'hôte (504, 506, 508). Les récepteurs impliqués dans la reconnaissance de GBS par les DCs au niveau des domaines de radeaux lipidiques sont cependant inconnus. Quelques pistes pourraient être davantage étudiées dont la reconnaissance par les Siglecs et l'intégrine CD11b/CD18 (CR3), deux récepteurs connus pour interagir avec les radeaux lipidiques (509, 510), mais aussi démontrés pour reconnaître GBS chez d'autres phagocytes professionnels (351, 511).

Les cavéoles sont un sous-ensemble de radeaux lipidiques dans la membrane cellulaire et sont définies par la présence des cavéolines. L'utilisation de souris déficiente en la cavéoline 1 (CAV-1) (incapacité de former des cavéoles) et les études de co-localisation entre GBS et la CAV-1 par microscopie confocale ont démontré que l'internalisation de GBS est dépendante des radeaux lipidiques mais indépendante des cavéoles (**ARTICLE II**). Cependant, nous ne pouvons pas exclure complètement la possibilité que chez les DCs, l'internalisation peut se produire par les cavéoles et les radeaux lipidiques et qu'en l'absence de la CAV-1, l'internalisation serait dirigée par les radeaux lipidiques seulement. La redondance est un événement commun chez de nombreux pathogènes à Gram + (246). À la différence de GBS, il a été clairement observé que plusieurs pathogènes, dont *S. pyogenes*, *S. uberis*, *C. trachomatis*, *P. aeruginosa* et *E. coli*, utilisent les cavéoles comme porte d'entrée dans les cellules non-phagocytaires et/ou phagocytes professionnels (246, 267, 268, 506, 512).

Bien que controversé, il a déjà été rapporté que les TLRs ou les NLRs (particulièrement NOD2) pouvaient être impliqués en tant que récepteurs pour la phagocytose bactérienne (232, 513-516). Dans notre étude, ni l'internalisation par les DCs ni la survie intracellulaire de GBS de types III et V dans ces cellules sont perturbées en l'absence de la voie d'activation des TLRs (MyD88) ainsi que du récepteur intracellulaire NOD2 (**ARTICLE V**). Nos résultats sont en accord avec ceux démontrés chez les macrophages péritonéaux (338). Il est important de

souligner que pour *S. suis* de type 2, même si très peu de bactéries sont internalisées, cette internalisation n'est pas reliée non plus à ces récepteurs (456).

En résumé, nos résultats démontrent que GBS utilise de multiples mécanismes d'endocytose pour son entrée chez les DCs (mobilisation de l'actine, de la clathrine, de la dynamine et des radeaux lipidiques). Globalement, GBS de type III est internalisé par les DCs, sous la dépendance d'un réseau d'actine intact, via la voie dépendante des radeaux lipidiques et la voie dépendante de la clathrine ainsi que des voies indépendantes des cavéoles et de la clathrine. Comme mentionné précédemment, GBS de type III peut se retrouver dans différents compartiments intracellulaires (de façon intacte dans des phagosomes ou partiellement digéré dans des phagolysosomes) (464). L'utilisation de voies d'endocytose spécifiques pourrait donc être une stratégie pour GBS, comme pour d'autres pathogènes, d'éviter l'élimination intracellulaire, de persister dans l'hôte et ainsi avoir une conséquence importante dans la réponse immune (505). En effet, il a été rapporté que la voie d'endocytose pourrait influencer le répertoire d'épitopes antigéniques présenté aux cellules T, et par extension, influencer le type de réponse des cellules T (517).

1.3 Activation et maturation des DCs en contact avec GBS ou *S. suis*

Différents types de leucocytes accomplissent des tâches spécialisées dans la présentation d'antigènes et la destruction de pathogènes (495). La fonction principale des DCs est d'alerter le système immunitaire et non pas d'éliminer les pathogènes envahisseurs. Une des conséquences de l'interaction des bactéries avec les DCs est l'induction de la maturation ainsi que de leur activation. Ce processus est important et fait des DCs un lien essentiel entre les immunités innées et adaptatives. GBS, une bactérie intracellulaire transitoire, et *S. suis*, une bactérie extracellulaire, sont aptes à induire l'expression accrue de molécules de co-stimulation ainsi que la libération de plusieurs cytokines et chimiokines chez les DCs murines [ARTICLES I, II, V et VI; ANNEXE, ARTICLE VII et (494, 518)]. Pour GBS, dans des conditions similaires, différentes souches d'un même sérotype (chez GBS de type III par exemple) ou différents sérotypes (type III versus type V) libèrent des niveaux semblables de cytokines (ARTICLE V; ANNEXE, Figure 34). Cependant, la production de ces cytokines diffère selon le type de DCs utilisées. En effet, la production en général est plus élevée dans les bmDCs infectées par GBS de type III que chez les DCs spléniques. Une observation similaire a été rapportée chez *L. monocytogenes* (519). Dans un même modèle d'étude (dans

ce cas-ci murin), l'origine des DCs aurait donc un impact plus important que l'origine de GBS dans ces interactions. Il serait donc intéressant de voir si les DCs humaines sont aussi aptes à être activées par GBS. L'influence de l'internalisation de GBS sur l'activation et la maturation des DCs a aussi été évaluée. En inhibant complètement l'internalisation de GBS, certaines cytokines se sont révélées être dépendantes et/ou indépendantes de l'internalisation alors que la phagocytose de GBS n'est pas essentielle pour l'expression de molécules de co-stimulation par les DCs. Ces résultats indiquent que des récepteurs extracellulaires et intracellulaires sont importants dans ces processus.

Similairement à GBS, différents sérotypes de *S. suis* (types 2 et 14) induisent la libération de niveaux semblables de cytokines (**ARTICLE VI; ANNEXE ARTICLE VII**). Par contre, chez les DCs humaines, les sérotypes de *S. suis* diffèrent dans leur capacité à activer les DCs et à induire une production de cytokines (501). Par exemple, les types 2 et 14 sont parmi les moins efficaces pour activer et amener la maturation des DCs (production de cytokines et expression de molécules de co-stimulation). Il a été proposé que l'épaisseur de la CPS chez *S. suis* pourrait également moduler l'activation des cytokines en influençant la libération de PAMPs tels que les lipoprotéines et le LTA. Chez les DCs porcines, *S. suis* de type 2 favorise également la production de cytokines, mais n'arrive pas à induire la maturation de ces cellules (500). Globalement, *S. suis* est donc apte à activer les DCs et cette activation diffère selon le modèle d'étude utilisée.

Pour conclure cette section, la production de cytokines et chimiokines diffèrent chez les DCs infectées par GBS ou *S. suis* (**ARTICLES I, II, V, VI**). En effet, GBS produit de plus grandes quantités de cytokines que *S. suis* telles qu'IL-12p70, TNF- α ou IL-6. De plus, l'inhibition de la phagocytose démontre que GBS active les DCs via des récepteurs à la surface des DCs, mais aussi via des récepteurs intracellulaires et augmente donc les possibilités d'activer les DCs comparativement à *S. suis*, où la reconnaissance par les DCs se fait principalement via des récepteurs à la surface cellulaire. Une plus faible activation des DCs par *S. suis* pourrait donc éviter une réponse immunitaire efficiente et lui permettre de se disséminer dans l'organisme. GBS active pleinement les DCs et pourrait trouver un autre moyen pour empêcher l'activation du système immunitaire. Certains facteurs de virulence pourraient contrer cette pleine activation des DCs en favorisant leur apoptose, ce qui a déjà été démontré chez les macrophages (520, 521). Dans notre modèle d'étude, nous avons utilisé un agent bactériostatique (le chloramphénicol) pour contrôler l'effet cytotoxique de GBS sur les

DCs et permettre la caractérisation des interactions de ce pathogène avec ces cellules. Finalement, les voies d'endocytose spécifiques n'ont pu être évaluées dans l'activation et la maturation des DCs en contact avec GBS dues aux effets cytotoxiques des inhibiteurs d'internalisation sur de longues périodes d'incubation. Il pourrait être intéressant dans le futur d'évaluer l'expression de certains gènes pro-inflammatoires chez les DCs infectées par GBS sur des périodes plus courtes.

1.4 Récepteurs de reconnaissance impliqués dans la réponse face à GBS ou à *S. suis*

Comme la protéine adaptatrice MyD88 est un important médiateur dans de nombreuses voies de transduction du signal dans l'immunité innée (522), son importance dans la production de cytokines par les DCs après une infection à GBS a été évaluée. Le rôle *in vivo* de MyD88 chez la souris lors d'une infection à GBS de type III ou de type V a déjà été démontré (voir section 3.2.4) (523). MyD88, et par extension la voie des TLRs, est cruciale pour la production de diverses cytokines et chimiokines par les DCs en contact avec GBS [ARTICLE V et (518)]. Chez les récepteurs extracellulaires, le rôle du TLR2 dans la pathogénèse de l'infection à GBS a déjà été abordé et son importance *in vivo* et *in vitro* ne fait pas consensus (voir section 3.2.4 de la revue de la littérature). En effet, le rôle de TLR2 dans l'immuno-pathogénèse de l'infection à GBS reste donc controversé et semble dépendre du modèle d'infection, de la dose bactérienne, du sérotype de GBS utilisés ainsi que le type de cellule immunitaire utilisé. Chez les DCs infectées par GBS, TLR2 a un rôle partiel dans la production de cytokines et chimiokines [ARTICLE V et (518)]. Ceci pourrait indiquer que d'autres TLRs sont impliqués dans la reconnaissance de GBS ainsi que de possibles voies compensatoires.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons démontré que l'internalisation de GBS par les DCs est grandement nécessaire pour la modulation de certaines cytokines et chimiokines (ARTICLE I, II et V). Par contre, au début de ce projet de thèse, peu d'études avaient abordé la reconnaissance de GBS par des récepteurs intracellulaires (336, 348). Le rôle de NOD2 dans le cadre d'infection à d'autres bactéries, telles que *S. aureus* et *S. pneumoniae*, ne fait pas présentement consensus (515, 524-527). En effet, NOD2 pourrait être protecteur ou délétère selon la dose bactérienne ou le modèle d'infection utilisé. *In vivo*, NOD2 ne semble pas jouer un rôle important dans la pathogénèse de la maladie causée par GBS dans un modèle d'infection chez la souris (ARTICLE III et IV). En effet, la production de cytokines est

partiellement atténuée chez les souris déficientes en NOD2 et cette réponse inflammatoire réduite n'influence pas de manière significative la charge bactérienne dans le sang ou la survie des souris. Néanmoins, nos résultats *in vitro* ainsi que ceux d'autres groupes suggèrent que les DCs ne contribuent pas à cette réponse inflammatoire dépendante de NOD2 et que d'autres cellules immunitaires seraient impliquées [**ARTICLE V** et (348)] L'absence de NOD2 ne semblerait pas affecter non plus la réponse immunitaire adaptative. Cependant, d'autres études seraient nécessaires pour mesurer l'impact de NOD2 dans cette réponse. Nous ne pouvons pas non plus exclure la possibilité que d'autres voies compensatoires puissent également être impliquées, telles que les TLRs intracellulaires (TLR7 et/ou TLR9 entre autres) ou d'autres récepteurs intracellulaires cytosoliques comme le NLRP3 (494, 518, 528).

À notre connaissance, aucune étude *in vivo* n'a adressé l'effet de MyD88 ou de NOD2 dans l'immuno-pathogénèse des maladies causées par *S. suis*. Par contre, récemment, il a été rapporté que l'importance de TLR2 *in vivo* semble grandement dépendre de la souche utilisée (357). Deux études parallèles *in vitro* dans notre laboratoire, ainsi qu'une autre chez les DCs humaines, ont porté sur les récepteurs impliqués dans la reconnaissance de *S. suis* de type 2 par les DCs [**ARTICLE IV** et (456, 501)]. Chez les DCs murines, la production de cytokines et l'expression des molécules de co-stimulation sont fortement dépendantes de la voie de signalisation via MyD88 et suggèrent que les DCs reconnaissent *S. suis* principalement via les TLRs (456). Cette observation avait également été décrite chez les macrophages infectés par *S. suis* de type 2 (215). De plus, l'absence de TLR2 altère la libération de plusieurs cytokines et l'expression de molécules de co-stimulation (456). Différents sérotypes sont également capables d'activer la voie de signalisation enclenchée par TLR2/TLR6 chez les cellules humaines ou porcines (355, 456, 500, 501). Malgré le fait que *S. suis* de type 2 soit faiblement phagocyté par les DCs, le faible nombre de bactéries internalisées et dégradées ou l'ingestion de composants de *S. suis* morts semble être suffisant pour qu'il soit reconnu par des récepteurs intracellulaires TLRs ou NOD2 et avoir un impact sur l'activation et la maturation des DCs (456). Le rôle de TLR9 a également été observé dans la production de cytokines chez les cellules mononucléaires périphérique du sang (PBMCs) humaines en contact avec des lysats de *S. suis* (355). Similairement à GBS, d'autres voies compensatoires ou des effets synergiques de divers récepteurs sont impliqués dans l'activation et la maturation optimale des DCs en contact avec *S. suis* (456).

Fait intéressant, l'induction de la chimiokine CXCL10 par GBS est indépendante de MyD88, mais cette induction requiert l'internalisation de GBS par les DCs (**ARTICLE I**). Le même constat a aussi été observé chez des macrophages déficients en MyD88 activés par le LPS (529). Dans le cas de *S. suis*, MyD88 a été partiellement impliquée dans la production de CXCL10 par les DCs exposées à ce pathogène [**ARTICLE IV** et (456)]. Étant donné que la voie dépendante de MyD88 est utilisée par tous les TLRs sauf TLR3, un rôle partiel de ce récepteur pourrait être possible. CXCL10 a la capacité d'interagir avec le récepteur CXCR3 qui est présent sur les cellules T et les cellules NK. De plus, un rôle crucial pour CXCL10 a été identifié lors de la défense de l'hôte au cours d'une septicémie microbienne (530). Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre cette voie d'activation particulière.

Pour conclure cette section, autant pour GBS que pour *S. suis*, la reconnaissance de ces bactéries encapsulées implique une combinaison de différents récepteurs extracellulaires et intracellulaires pour l'activation optimale des DCs.

2. Caractérisation des fonctions des cellules NK dans la réponse innée face à des bactéries encapsulées

2.1 Rôle des cellules NK dans l'immunité innée face à une infection causée par GBS ou par *S. suis*

Malgré tous les progrès dans la compréhension de la pathogénèse des maladies causées par des bactéries encapsulées, plus spécifiquement sur les interactions entre ces pathogènes et les cellules de l'immunité innée comme les DCs, les macrophages et les neutrophiles, peu de travaux ont porté sur l'importance des cellules NK pendant l'infection à GBS ou à *S. suis*. L'IFN- γ est une cytokine représentative et essentielle de l'immunité cellulaire protectrice et elle est associée principalement aux cellules NK et aux cellules T. L'IFN- γ est également une molécule clé faisant le lien entre la réponse innée et la réponse adaptative. Une analyse plus détaillée au niveau de la source cellulaire de la production d'IFN- γ dans la réponse immunitaire suite à une infection bactérienne aiguë à GBS ou à *S. suis* manque toujours. Au cours de ce projet de thèse, nous avons mis au point un modèle d'infection à GBS de type III chez la souris (**ARTICLES III et V; ANNEXE, ARTICLE X**) ainsi qu'un modèle d'infection chez la souris à *S. suis* de type 2 basé sur des études précédentes [**ARTICLE V;**

ANNEXES, ARTICLES IX et XI et (212, 531)]. En utilisant diverses approches expérimentales (*in vivo*, *ex vivo*), nos résultats ont démontré que les cellules NK sont les premiers lymphocytes à s'activer et à produire rapidement l'IFN- γ (**ARTICLE VI**). Cependant, la réponse des cellules NK est plus grande et soutenue lors d'infection à GBS qu'à *S. suis*, ce qui entraîne une cascade inflammatoire plus forte chez les souris infectées à GBS. Nous avons récemment rapporté que la souche hypervirulente de *S. suis* de type 2, responsable de l'épidémie mortelle humaine en Chine, a évolué pour activer massivement la production d'IFN- γ , conduisant à un syndrome rapide et mortel 'streptococcal toxic shock-like syndrome' (STSLs) (**ANNEXE, ARTICLE IX**). Une souche de *S. suis* d'origine européenne (comme celle utilisée dans cette thèse) a été démontrée être moins virulente que la souche épidémique chinoise et les analyses par puces d'ADN ont indiqué une induction inférieure de l'expression du gène pour l'IFN- γ chez des souris infectées par la souche européenne comparativement aux souris infectées avec la souche chinoise. Nos données confirment une réponse en IFN- γ plus faible induite par une souche de *S. suis* de type 2 d'origine européenne. Cependant, cette souche est capable d'induire des signes cliniques de septicémie, de méningite et de causer la mort, ce qui suggère qu'une réponse inflammatoire est induite et implique probablement d'autres cellules immunitaires innées et la production de cytokines. À cet égard, la production de TNF- α et l'expression de CD69 ont été observées dans des cellules spléniques provenant de souris infectées par *S. suis* (**ANNEXE, ARTICLE XI**).

Les cellules NK ont été identifiées dans de nombreuses études en tant que source principale d'IFN- γ au cours d'infections causées principalement par des pathogènes intracellulaires, tels que le *F. tularensis*, le *L. monocytogenes*, le *S. Typhimurium* et le *M. tuberculosis* (457, 459, 460, 532). En effet, à ce jour, très peu d'études ont adressé le rôle des cellules NK pendant les infections à streptocoques. Suite à l'infection bactérienne par GBS ou par *S. suis*, la quantité de cellules NK1.1+ (spécifique pour les cellules NK et NKT) dans la rate diminue. La cause de cette diminution (mort cellulaire ou migration cellulaire) n'est pas connue et mérite d'être approfondie dans le futur pour mieux comprendre cette fluctuation du nombre de cellules NK lors de l'infection par des streptocoques encapsulés.

Malgré que les cellules NK soient essentielles dans le contrôle de bactéries, elles peuvent également causer des dommages chez l'hôte, en particulier via leur production d'IFN- γ . Dans le cas de GBS de types III et V, l'IFN- γ a plutôt un rôle protecteur chez la souris (464). Par contre, chez *S. suis*, le rôle d'IFN- γ diffère selon la souche utilisée (**ANNEXE,**

ARTICLE IX). En effet, pour la souche européenne de type 2 (celle utilisée dans ce projet de recherche), IFN- γ semble jouer un rôle mineur dans l'immuno-pathogénèse de l'infection alors que chez la souche hypervirulente causant des STSLS chez l'homme, IFN- γ joue un rôle délétère dans l'infection. Il serait donc intéressant dans le futur de davantage caractériser le rôle des cellules NK et voir si l'absence de ces cellules, par une déplétion *in vivo* des cellules NK, a un impact important lors d'une infection à GBS ou à *S. suis*.

2.2 Importance des DCs dans l'activation des cellules NKs suite à une infection par GBS ou par *S. suis*

Il est bien connu que les macrophages et les DCs reconnaissent des PAMPs exprimés à la surface de divers pathogènes (234). De plus en plus d'études démontrent l'interaction directe des cellules NK avec des ligands dérivés de pathogènes via certains récepteurs, dont les TLRs (26, 453, 454, 492, 533-535). Cependant, dans notre modèle d'étude, GBS et *S. suis* n'arrivent pas seuls à activer directement les cellules NK *in vitro*. Le contact direct ou la présence de composants solubles provenant de streptocoques encapsulés ne semblent donc pas suffisants pour l'activation des cellules NK. Au cours de ce projet de thèse, nous avons développé et standardisé une culture *in vitro* de cellules NK qui permet d'augmenter la pureté de la culture ainsi que le nombre de cellules, tout en gardant une faible activation basale (**ARTICLE VI; ANNEXE, ARTICLE IX**). Ceci nous a permis de contourner les limites de la technique d'isolement des cellules NK par sélection négative et mesurer de façon certaine la capacité des bactéries à activer directement les cellules NK (en absence de contamination avec des APCs).

À ce jour, plus d'une cinquantaine d'études ont regardé les interactions entre les APCs et les cellules NK autant d'origine humaine que murine. La nécessité des cellules accessoires pour l'activation optimale des cellules NK lors de l'infection devient de plus en plus documentée (26). Parmi ces études, plus de la moitié se sont intéressées aux interactions entre les DCs et les cellules NK. Au début de ce projet de thèse, aucune étude n'avait été adressée entre ces deux types cellulaires et des streptocoques. Chez *S. suis*, aucune donnée n'était disponible. Chez GBS, une étude avait démontré que les cellules dérivées de la moelle osseuse nécessitaient la présence de macrophages péritonéaux pour produire de l'IFN- γ en présence de GBS (490). Cependant, ces cultures contenaient moins de 40% de cellules NK.1.1+. De plus, il a été démontré qu'IL-12 et IL-18 ont des effets thérapeutiques en

augmentant la production d'IFN- γ par les cellules du système immunitaire lors d'une infection à GBS de type III (487-489), ce qui laisse présumer une importance cruciale des APCs. Les DCs, en contact avec GBS ou *S. suis*, produisent plusieurs cytokines et chimiokines, notamment l'IL-12, (**ARTICLES I, II, V et VI ; ANNEXE, ARTICLES VII et VIII**) et ont donc le potentiel d'activer les cellules NK. En utilisant des études *in vitro* de co-culture de cellules NK et de DCs, nous avons démontré que les DCs infectées par GBS ou par *S. suis* sont des inducteurs importants de la production d'IFN- γ par les cellules NK et que le contact direct entre ces cellules est critique pour cette production. Des observations similaires ont été remarquées dans des co-cultures infectées par *L. monocytogenes* et *Streptococcus salivarius* (491, 536). Similairement, chez l'homme, *S. aureus* active les cellules NK du sang grâce en partie aux interactions directes avec des monocytes (537). En concordance avec les données *ex vivo*, GBS induit une plus forte production d'IFN- γ par les cellules NK *in vitro* que *S. suis*.

Nos études n'ont pas permis d'identifier les composants moléculaires impliqués dans le contact direct entre les cellules NK et les DCs dans le contexte d'infection *in vitro* par GBS de type III. La présence de mécanismes compensatoires pourrait expliquer la difficulté de caractériser ces contacts ou que d'autres ligands/récepteurs sont plus importants que le LFA-1 et le NKG2D, tels que le CD40L ou le CD28 (538, 539). En effet, les DCs augmentent l'expression de plusieurs molécules de co-stimulation en contact avec GBS ou *S. suis* (**ARTICLE I; ANNEXE, ARTICLE VII**). Cependant, nos études ont permis de suggérer, contrairement chez GBS et *S. salivarius* (536), un rôle important de LFA-1 dans la production d'IFN- γ par les cellules NKs en présence de DCs infectées par *S. suis*. D'autre part, et contrairement aux infections par le *P. aeruginosa*, NKG2D n'a aucun effet sur la production d'IFN- γ chez les cellules NK pendant l'infection à GBS ou à *S. suis*. Des résultats similaires ont été observés dans les co-cultures de DCs et de cellules NK en contact avec *S. salivarius* (536). Nos données et ceux provenant de la littérature suggèrent que les mécanismes moléculaires impliqués dans la synapse immunologique entre les DCs et les cellules NK varient d'un pathogène à l'autre et ne peuvent pas être généralisés.

Malgré l'importance du contact physique entre les cellules NK et les DCs, nous avons aussi observé un rôle partiel des facteurs solubles dans l'activation des cellules NK, en particulier dans la production d'IFN- γ . Nous pouvons suggérer qu'IL-12 ou d'autres cytokines produites par les DCs n'arrivent pas seules à activer pleinement les cellules NK. D'autre part, l'activation des cellules NK a eu un effet synergique dans l'induction de la production de

cytokines et de chimiokines par les DCs en réponse à GBS ou à *S. suis*, notamment par l'augmentation de la production d'IL-12, et ce, de façon dépendante du contact cellulaire. Il est connu que les cellules NK et les DCs s'entraident l'une l'autre pour acquérir complètement leurs fonctions. L'IL-12 a été montrée pour être une cytokine clé dans l'activation des cellules NK par les cellules accessoires (386). En ce sens, nos résultats ont démontré que l'IL-12 est requise pour une production optimale d'IFN- γ par les cellules NK dans le contexte d'infection à *S. suis*. Des observations similaires ont été rapportées dans des co-cultures de DCs et de cellules NK avec *L. monocytogenes* (491). Contrairement à *S. suis*, l'IL-12 produite dans des co-cultures infectées par GBS n'est pas essentielle à la production d'IFN- γ par les cellules NK et laisse suggérer une redondance ou l'importance d'autres cytokines telles que l'IL-18 ou l'IL-15 (518). À ce jour, aucune étude n'a signalé la production d'IL-15 par les DCs infectées par GBS ou par *S. suis*. Par contre, il pourrait être intéressant d'étudier le rôle de la trans-présentation d'IL-15 dans les interactions entre les DCs et les cellules NK dans un contexte d'infection par GBS, où un tel rôle a déjà été observé avec le LPS d'*E.coli* (540). Finalement, les IFNs de type I peuvent aussi induire la production d'IFN- γ par les cellules NK (541) et l'IFN- β produit par les DCs infectées par GBS pourrait ainsi contribuer à l'activation des cellules NK dans les co-cultures en contact avec GBS (494).

L'effet synergique de l'activation des cellules NK sur les DCs semble être différent lors d'infections à GBS ou à *S. suis*. Après un contact direct avec des cellules NK, les DCs infectées par GBS sont responsables de la production de la chimiokine CXCL9 alors que ce n'est pas le cas pour *S. suis* de type 2. Nous avons démontré la production de cette chimiokine chez les DCs spléniques suite au contact avec GBS de type III (**ARTICLE I**). Il est connu que les cellules NK humaines, par exemple, peuvent migrer en réponse à des ligands connus pour le récepteur CXCR3 comme le CXCL9 et le CXCL10 (480) et laisse suggérer que les cellules NK activées pourraient moduler la production de chimiokines spécifiques par les DCs pour mobiliser d'autres cellules NK, et même par extension des cellules T, vers la région d'interaction. En présence de *S. suis*, les DCs sont capables, quoique faiblement, de sécréter le CXCL9 (**ANNEXE, ARTICLE VII**). Cependant, les conditions expérimentales étaient différentes de celles utilisées pour les co-cultures de DCs et de cellules NK, ce qui pourrait expliquer cette faible production. L'absence ou la faible production de CXCL9 par les DCs infectées par *S. suis*, et par conséquent, une mobilisation moins grande des cellules NK, pourrait expliquer une plus faible production d'IFN- γ chez les cellules NK. Il pourrait être

intéressant d'étudier plus attentivement l'importance de cette chimiokine dans les interactions entre les DCs et les cellules NK en présence de GBS.

L'importance des voies d'endocytose et/ou des récepteurs de reconnaissance de GBS ou de *S. suis* par les DCs dans l'activation de cellules NK n'a pas été évaluée dans le cadre de cette thèse. Par contre, des études préliminaires chez GBS ont suggéré que la voie des TLRs est importante dans l'activation des cellules NK, en particulier dans la production d'IFN- γ . Chez *S. typhimurium*, le récepteur intracellulaire NLRC4 (inflammasome) chez les DCs est requis pour la production d'IFN- γ par les cellules NK (459). Le rôle des inflammasomes, dont NLRP3, dans l'activation des cellules NK lors d'une infection à *S. pneumoniae* a aussi été suggéré (461, 462). GBS interagit avec NLRP3 chez les DCs et les macrophages (518, 542) et pourrait donc avoir un impact sur l'activation des cellules NKs. Chez *S. suis*, le TLR2 chez les DCs, qui joue un rôle dans la production d'IL-12 (456), pourrait quant à lui intervenir dans la production d'IFN- γ par les cellules NK.

2.3 Rôle potentiel des cellules NK dans l'immunité adaptative face à GBS ou à *S. suis*

Plusieurs études *in vivo* ont montré que l'IFN- γ dérivé des cellules NK est critique pour la polarisation de la réponse Th1 (543-546). Dans tous ces modèles, les pathogènes activeraient indirectement les cellules NK pour produire l'IFN- γ par l'intermédiaire de l'induction de la production d'IL-12 par les macrophages ou par les DCs. Les cellules NK ont été décrites aussi pour réguler les réponses des cellules T CD4⁺ avant la présentation de l'antigène par les DCs grâce à leur production d'IL-10 (547) ou du TGF- β (548). Les cellules NK peuvent affecter non seulement la nature de la réponse immunitaire des cellules T, mais également le recrutement de sous-populations spécifiques de lymphocytes T, en modulant la libération de différentes chimiokines. Par exemple, durant une infection virale ou bactérienne, la production d'IFN- γ par les cellules NK est essentielle pour la libération locale de la chimiokine CXCL9 qui attire les cellules T activées au site d'infection (549) ou par la libération de chimiokines (CCL3, CCL4, CCL5) par les cellules NK elles-mêmes pour recruter et activer d'autres cellules inflammatoires (550, 551). Il devient de plus en plus évident que les cellules NK peuvent moduler la qualité et l'ampleur de la réponse immunitaire adaptative. Par exemple, elles peuvent activer ou tuer les APCs et les cellules Treg, augmenter le nombre de cellules T cytotoxiques et leurs fonctions effectrices, polariser ou tuer les cellules Th et améliorer

l'activation des cellules B et la commutation isotypique (552). Les APCs ont donc avantage à activer ces cellules pour enclencher une réponse immunitaire efficace.

Lors d'une infection à GBS chez la souris, les splénocytes totaux sécrètent diverses cytokines évoquant une réponse de type 1 pro-inflammatoire (**ANNEXE, ARTICLE X**). Parmi ces cellules, les cellules NK, grâce à l'activation des APCs, sont les premières à être activées et à sécréter l'IFN- γ (**ARTICLE VI**). Cette activation pourrait avoir un effet bénéfique sur la maturation optimale des APCs et en retour, activer davantage de cellules NK mais aussi de cellules T. En effet, nos résultats démontrent une production accrue d'IL-12 par les DCs en présence de cellules NK activées et une production de chimiokines telles que le CCL3, le CXCL9 ou le CXCL10 chez les splénocytes totaux infectés, dont les DCs, pourraient être impliquées dans cette production, ce qui permettrait de recruter activement les cellules T et induire une réponse de type Th1. Le récepteur CXCR3 est rapidement induit sur les cellules T naïves et subsiste sur les cellules T CD4⁺ de type Th1 activées (553). De plus, la production d'IFN- γ ainsi que d'autres cytokines par les cellules T arrivent plus tard au cours de l'infection. Les DCs sont aussi aptes à activer les cellules T. Nous suggérons que l'activation des cellules T CD4⁺ pourrait se faire directement par leur interaction avec les APCs ou indirectement via les cellules NK. Nos résultats suggèrent également que GBS arrive à induire une réponse mémoire des cellules T CD4⁺ (**ANNEXE, ARTICLE X**). Par contre, une caractérisation plus détaillée reste nécessaire. Bien que ce projet de thèse caractérise pour la première fois l'importance cruciale des DCs dans la production d'IFN- γ par les cellules NK et les cellules T CD4⁺, une compréhension plus détaillée de tous les mécanismes de régulation de la production d'IFN- γ au cours de l'infection à GBS nécessite de plus amples recherches. Par exemple, comme mentionné précédemment, les voies d'endocytose utilisées et la persistance de GBS dans les APCs pourraient moduler leur activation, et par conséquent, la réponse des lymphocytes dont les cellules NK et les cellules T.

Chez *S. suis*, les splénocytes totaux sécrètent eux aussi diverses cytokines et chimiokines impliquées dans une réponse Th1 (**ANNEXE, ARTICLE XI**). En dépit des similitudes dans le patron de production de cytokines et chimiokines, la production est beaucoup plus faible que chez les splénocytes provenant de souris infectées par à GBS dans des conditions expérimentales similaires. Les cellules NK sont les premières cellules productrices d'IFN- γ (**ARTICLE VI**) lors d'une infection à *S. suis* et les cellules T prennent la relève plus tard au cours de l'infection. Par contre, cette activation et cette production reste

faible autant chez les cellules NK que chez les cellules T *in vivo*. Cependant, une expérience préliminaire au laboratoire a montré que les souris déficientes du récepteur aux cellules T (TCR) sont plus sensibles à une infection à *S. suis* que les souris contrôles, ce qui suggère malgré tout un rôle important pour les cellules T au cours de l'infection à *S. suis*. Autant pour les cellules NK que pour les cellules T, les DCs sont essentielles dans l'activation de ces lymphocytes et cette activation est moins forte que dans le cadre d'une infection à GBS, ce qui corrèle avec les observations *in vivo*. Malgré que *S. suis* active les DCs, cette activation n'est peut-être pas suffisante ou optimale pour activer pleinement les cellules NK et les cellules T. De plus, contrairement à GBS, la réponse mémoire des cellules T CD4⁺ ne semble pas s'installer, ou du moins est limitée, lors d'une infection à *S. suis* avec une faible production d'anticorps spécifiques pour *S. suis*. Ces résultats suggèrent que *S. suis* a des propriétés immunosuppressives. Les mécanismes exacts responsables de la suppression de la réponse immunitaire lors de l'infection à *S. suis* devront toutefois être plus approfondis.

3. Impact de la CPS dans l'immunité innée face à des streptocoques encapsulés

Autant pour GBS que pour *S. suis*, la CPS définit le sérotype et est considérée comme un facteur de virulence essentiel pour ces deux espèces bactériennes (2, 3, 5, 8). De plus, ces deux streptocoques sont les seules bactéries à Gram + ayant l'acide sialique en position terminale dans la composition de leur CPS. En dépit de cela et d'autres similarités biochimiques et structurales de la CPS (8, 16, 17), les mécanismes et les interactions de GBS et de *S. suis* avec les composants du système immunitaire semblent différer (3, 5, 18). Au début de ce projet de recherche, aucune donnée n'était disponible sur l'effet de la CPS dans les interactions de ces pathogènes avec les DCs. La construction de mutants isogéniques non encapsulés pour chaque espèce bactérienne a permis de mieux comprendre ces interactions. Cependant, des études *in vivo* n'ont pu être toutefois effectuées avec ces mutants puisqu'ils sont rapidement éliminés chez l'hôte (3, 5, 46).

3.1 La CPS de GBS : un composant intrigant

Les CPSs de GBS de type III peuvent aider à retarder l'internalisation de GBS et favoriser, en partie, sa survie intracellulaire au début de l'infection chez les DCs (**ARTICLES I et V**). Les légères particularités entre divers sérotypes (en particulier types III et V) peuvent

s'expliquer par la structure de chaque CPS (similaires dans leur composition, mais antigéniquement distinctes)(8). Chez les macrophages, la CPS de type III n'intervient ni dans l'internalisation, ni dans la survie intracellulaire (18, 408). La contribution de la CPS quant à la modulation des fonctions des macrophages versus les fonctions des DCs pourrait être différente. Dans notre système, nous pouvons dire que la CPS de GBS n'est pas un facteur anti-phagocytaire et intervient très peu dans la survie intracellulaire de GBS. Cependant, la CPS semble être importante pour la reconnaissance de GBS par un possible récepteur via les radeaux lipidiques (**ARTICLE II**) et laisse suggérer que la CPS peut moduler les voies d'endocytose de GBS chez les DCs. Les Siglecs ont été rapportés pour réguler l'internalisation via des voies d'endocytose dépendante du cholestérol et/ou des radeaux lipidiques dont l'internalisation de *N. meningitidis* (509). Concernant GBS, il a été rapporté que la CPS sialylée de GBS engage le Siglec-9 chez les neutrophiles, ayant comme conséquence d'influencer la réponse immunitaire innée (351, 510, 511). L'intégrine CD11b/CD18 (CR3) peut également être l'un des récepteurs potentiels exploités par GBS au niveau des radeaux lipidiques (510, 511). La CPS de GBS n'a aucun effet sur la maturation des DCs et elle a peu d'effet sur la sécrétion de plusieurs cytokines (**ARTICLES I, II, V et VI; ANNEXE ARTICLE I**). Il est même surprenant d'observer une tendance à une production plus forte de cytokines en présence de la CPS. Cet effet est davantage observé chez les DCs d'origine splénique. La perte de la CPS, qui laisse ainsi l'accès à des composants fortement immunogéniques de la paroi bactérienne de GBS, devrait être associée à une activation plus forte des DCs, ce qui n'est pas le cas ici. Les seules cytokines qui sont davantage produites par les DCs en contact avec un mutant non encapsulé de GBS sont l'IL-10 et l'IL-23. Deux hypothèses pourraient expliquer ces observations. Tout d'abord, l'augmentation de la production d'IL-10 par les DCs en absence de la CPS pourrait réduire la production des autres cytokines, et l'élimination plus forte et rapide du mutant non encapsulé pourrait aussi réduire la production de cytokines par les DCs.

Malgré des divergences dans la capacité immunogénique de la CPS de GBS à produire des cytokines, un consensus règne à l'effet que la CPS est un stimulateur médiocre par rapport aux autres composants de la paroi bactérienne (98, 343). Le PGN de GBS est plus efficace que le LTA ou la CPS pour induire la production de cytokines (98). La paroi bactérienne de GBS contient deux polysaccharide (PS) ancrés au PGN: la CPS et l'antigène du groupe B (GBC). Récemment, un mutant GBS isogénique déficient en GBC a été créé (346). Chez les DCs, l'absence de GBC affecterait davantage la production de cytokines que l'absence de la CPS (**ANNEXE, Figure 33**). Des études sont en cours avec l'utilisation de

parois bactériennes purifiées de ses souches pour confirmer ces résultats. Finalement, les CPSs de GBS pourraient aussi avoir un certain effet suppresseur sur l'activation des DCs, plus particulièrement sur la capacité d'induire l'expression de BAFF, une cytokine essentielle dans le développement de la réponse en Abs [ANNEXE, ARTICLE VIII et (554)]. D'autres études ont également rapporté des effets similaires chez les DCs murines avec la CPS de GBS de type V et de *N. meningitidis* de type C (554). La CPS de GBS, autant de type III que de type V, n'a pas d'effet sur l'activation des cellules NK (ARTICLE VI) alors que c'est le contraire chez les cellules T où la présence de la CPS favorise une activation plus forte et une plus grande production d'IFN- γ par les cellules T (ANNEXE, ARTICLE IX). Il est possible que l'activation moins forte chez les DCs en présence du mutant non encapsulé se traduirait également par une activation diminuée chez les cellules T. Le fait que la souche encapsulée survit intracellulairement plus longtemps que la souche non encapsulée dans les DCs et expose ainsi plus longtemps une charge antigénique pourrait être une explication, mais il reste qu'il s'agit d'une hypothèse à valider. Ces résultats démontrent que l'effet de la CPS de GBS peut différer selon le type cellulaire.

3.2 La CPS de *S. suis* : un facteur anti-phagocytaire

Au contraire à GBS, les CPSs de *S. suis* sont clairement un facteur anti-phagocytaire chez les DCs [ANNEXE, ARTICLE VII et (500, 501)], comme c'est le cas chez les monocytes/macrophages et les neutrophiles d'origine murine ou porcine (3, 18, 162, 165, 231). Chez les DCs humaines, les CPSs de différents sérotypes de *S. suis* interagissent différemment et laissent suggérer que la CPS pourrait ne pas être le seul facteur anti-phagocytaire, laissant ainsi la porte ouverte à l'implication d'autres facteurs de virulence. En effet, Lecours *et al.* avaient observé chez les DCs murines une tendance d'un mutant isogénique, déficient en D-alanylation du LTA et en N-déacétylation du PGN, à être davantage internalisé que la souche WT (456). Cependant, similairement à GBS, la composition de la CPS chez *S. suis* pourrait aussi avoir un impact. À ce jour, l'acide sialique n'a pu être démontré pour être présent chez tous les sérotypes (16, 17, 157, 158). Ici, la présence de l'acide sialique pourrait avoir un effet inhibiteur sur la phagocytose et l'absence d'un mutant isogénique déficient en acide sialique (sans affecter l'expression de la CPS de *S. suis*) ne permet pas de répondre à cette hypothèse pour le moment (555). Chez les DCs porcines et humaines, la CPS n'influence pas la survie intracellulaire de *S. suis* de type 2 (500, 501) et pourrait suggérer la même situation chez les DCs d'origine murine. À la vue de ces résultats,

nous pouvons conclure globalement que la localisation extracellulaire de *S. suis* lui confère un avantage pour sa survie et sa CPS est critique dans ce processus. En effet, il a été démontré récemment que la CPS de *S. suis* de type 2 a un rôle actif et spécifique à la surface cellulaire et qu'elle n'agit pas seulement comme une barrière physique (556). En effet, la CPS semble perturber activement les processus cellulaires essentiels impliqués dans la phagocytose. Plus particulièrement, la perturbation des radeaux lipidiques par la CPS empêcherait la phagocytose de *S. suis* de type 2. D'autres études auparavant avaient aussi démontré que certaines cascades de signalisation pouvaient être activées ou inhibées par la CPS suite à l'adhésion de *S. suis* à des phagocytes tels que les macrophages ou les cellules de la microglie (162, 231). En l'absence du bouclier que fait la CPS, l'exposition de composants très immunogéniques de la paroi bactérienne peut induire une activation accrue des DCs, comme cela a déjà été observée chez d'autres pathogènes encapsulés (557). De plus, les CPSs de *S. suis* de types 2 et 14 interfèrent de façon critique et marquée avec la libération de plusieurs cytokines par les DCs de différentes origines cellulaires [**ARTICLE VI; ANNEXE, ARTICLE VII** et (500, 501)]. Alors que la CPS influence l'expression de molécules de co-stimulation chez les DCs d'origine porcine et humaine, ceci n'est pas le cas chez les DCs murines (500, 501). Les différences pourraient être reliées à l'origine des DCs (murine, porcine ou humaine) et aussi par le fait que les DCs d'origine murine proviennent d'une lignée de souris consanguines (population plus homogène) alors que les DCs porcines ou humaines proviennent d'une population plus hétérogène. Les composants de la paroi bactérienne agissent donc comme des immunomodulateurs majeurs et la CPS masque leur expression (211, 215, 231). En effet, le LTA, le PGN ou la suilysine (SLY) aurait un pouvoir stimulateur plus grand que la CPS (**ANNEXE, ARTICLES VII et VIII**). Contrairement à GBS, les CPS de *S. suis* de types 2 et 14 interfèrent avec la libération d'IFN- γ par les cellules NK ainsi que les cellules T (**ARTICLE VI, ANNEXE, ARTICLE X**). Finalement, comme pour GBS, les CPSs de *S. suis* aurait un effet plutôt suppresseur sur l'expression de BAFF et concorderait avec les propriétés immunosuppressives de *S. suis* sur le système immunitaire de la souris.

3.3 Les cas particuliers de CCL2 et CCL3

Comparativement aux autres cytokines et chimiokines testées (**ARTICLE I**), les CPSs de GBS encapsulé de types III et V interviennent dans la production de CCL2 et de CCL3 par les DCs infectées par GBS encapsulé (**ARTICLES II et V**). De plus, ce sont les seules chimiokines produites par les CPSs hautement purifiées de GBS de types III et V (**ANNEXE,**

ARTICLE VIII). La CPS pourrait donc être impliquée dans des événements menant à l'expression accrue de CCL2 et de CCL3 par des voies de signalisation spécifiques. Même si elle est non-essentielle pour l'internalisation de GBS, la CAV-1 pourrait être importante dans la production de CCL2 et la CPS modulerait ces interactions. Il n'est pas clair si l'entrée de GBS encapsulé par les radeaux lipidiques facilite la signalisation intracellulaire régulée par la CAV-1 ou les radeaux lipidiques favorisent l'activation de PRRs connus. La contribution de la CAV-1 dans l'induction de la production de CCL2 médiée par la CPS dans l'immunopathogenèse de l'infection causée par GBS mérite donc d'être davantage examinée. CCL2 et CCL3 sont connues pour jouer un rôle majeur dans le recrutement sélectif de monocytes, de macrophages, de DCs et de lymphocytes aux sites d'inflammation (558, 559). CCL2 a été associée aux signes cliniques de septicémies chez les nouveaux-nés infectés par GBS (560). Malgré que la CPS de *S. suis* de type 2 nuise à la libération de plusieurs cytokines, les CPSs hautement purifiées de types 2 et 14 sont capables d'induire le CCL2 et le CCL3 chez les DCs (**ANNEXE, ARTICLE VIII**). Des études antérieures avaient aussi montré que la CPS de *S. suis* de type 2 était nécessaire à la production optimale de CCL2 par des monocytes humains, des cellules endothéliales du cerveau ainsi que des leucocytes du sang (213, 215, 216). De plus, le CCL2 est également rapidement détectée au niveau du cerveau de souris infectée par *S. suis* de type 2 (212). La production de CCL3 chez les DCs stimulées avec les CPSs de GBS ou de *S. suis* est partiellement dépendante de TLR2 et de MyD88 alors que la production de CCL2 est indépendante de la voie des TLRs (**ANNEXE, ARTICLE VIII**). Il serait intéressant dans le futur de comprendre davantage l'utilité des CPSs de GBS et de *S. suis* à induire la production de ces chimiokines dans un contexte d'infection et, si l'attraction massive de leucocytes pourrait favoriser une réponse inflammatoire exacerbée et délétère pour l'hôte.

En résumé, ce projet de recherche a permis d'éclaircir les connaissances sur les interactions entre les DCs et les streptocoques encapsulés ainsi que leur impact sur l'activation de lymphocytes, en particulier les cellules NK et les cellules T, et conséquemment dans les réponses innées et adaptatives. Les données *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* démontrent que GBS et *S. suis* interagissent différemment avec les DCs et que ces différences ont un impact subséquent sur la réponse immune. Malgré ces divergences, GBS et *S. suis* utilisent un éventail de facteurs, dont la CPS, comme stratégie pour manipuler et éviter une réponse immunitaire efficiente. Les Figures 34 et 35 proposent des modèles d'interactions entre GBS ou *S. suis* et les DCs selon les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ainsi que ceux trouvés dans la littérature. Un modèle de l'effet de l'activation des DCs sur la réponse innée est proposé à la figure 36.

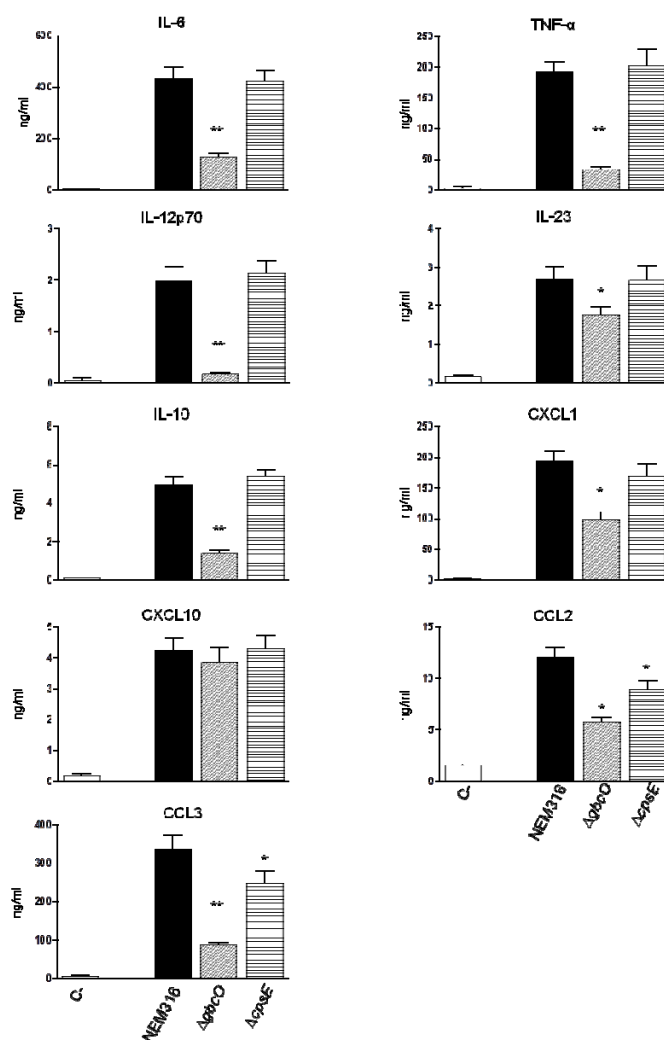


Figure 33. L'importance de GBC dans la production de cytokines par les DCs en contact avec GBS.

Les DCs dérivées de la moelle osseuse sont stimulées 16 heures avec les souches du GBS de type III, NEM316 (wild-type) et ses mutants déficients en GBC ou en CPS ($\Delta gbcO$ et $\Delta cpsE$, respectivement) (10^6 CFU/ml, initial MOI:1). Après 2 heures d'infection, le chloramphenicol (12 μ g/ml) est ajouté pour prévenir la toxicité cellulaire. Les cellules non-stimulées servent de contrôle négatif (C-) pour les niveaux d'expression basale. Le surnageant est récolté après 16 heures d'incubation et la production de cytokines est quantifiée par ELISA. Les données sont exprimées selon la moyenne \pm SEM (en ng/ml) de huit expériences indépendantes. * $P < 0.05$ et ** $P < 0.01$ indiquent des différences statistiques entre la souche wild-type et les mutants.

Abbreviations : CPS, capsule polysaccharidique; DC, cellules dendritiques; GBC, antigène du Groupe B; GBS, *Streptococcus* du Groupe B.

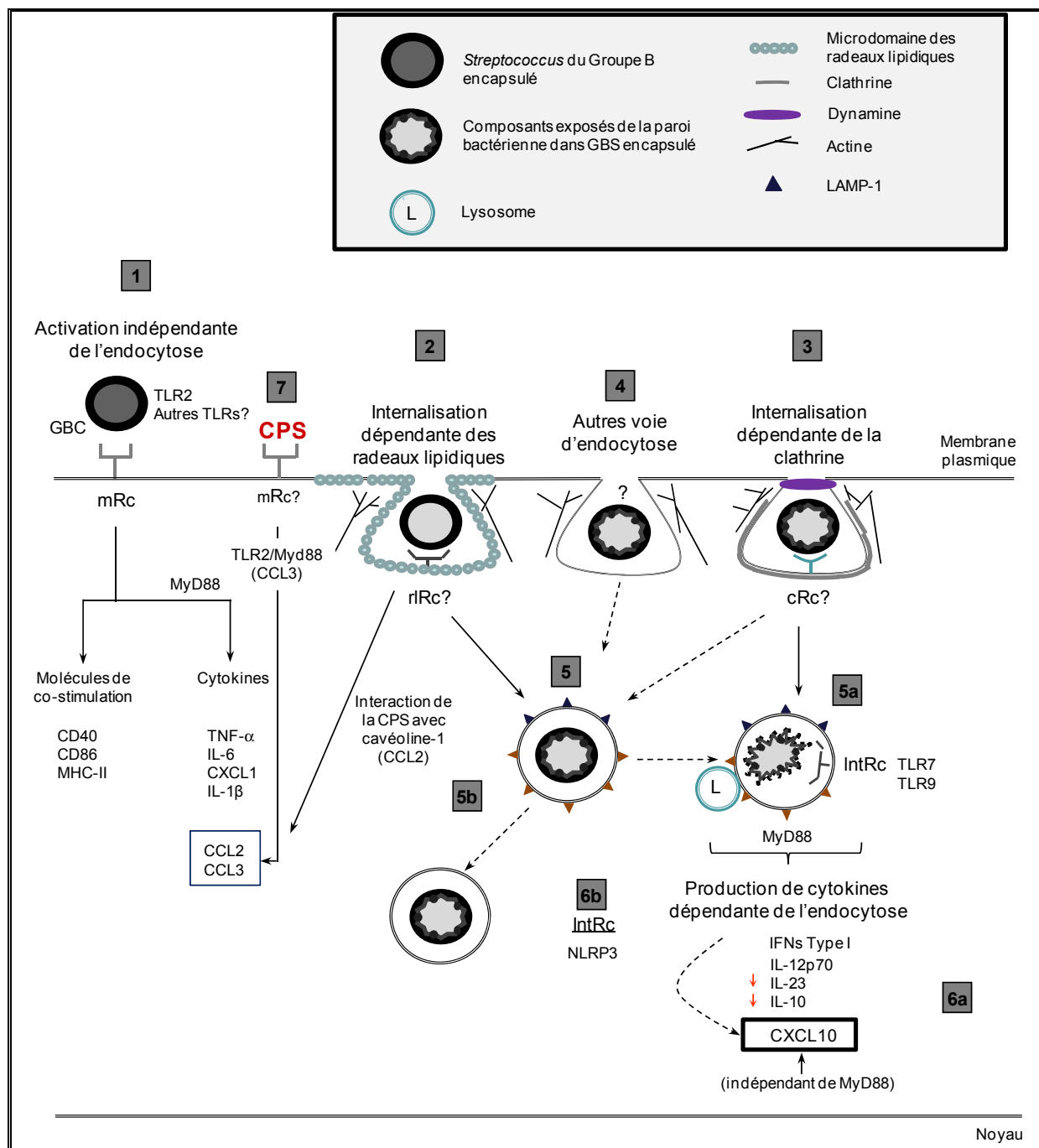


Figure 34. Modèle proposé des interactions entre GBS de type III et les DCs.

(1) GBS encapsulé interagit avec des récepteurs membranaires connus et inconnus (mRc). Cette reconnaissance induit la maturation des DCs (expression de CD40, CD86, et CMH-II). De plus, elle amène la production de plusieurs cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, CXCL1, CCL2 et CCL3) qui est dépendante de la voie des TLRs (MyD88) et en partie reliée à un mécanisme indépendant de l'endocytose. Cette activation initiale des DCs au contact de GBS est suivie de l'endocytose

bactérienne par deux voies principales. La présence de GBC est importante dans la production de cytokines par les DCs. **(2)** La présence de la CPS favorise l'endocytose de GBS dépendante des radeaux lipidiques (mais indépendante de la cavéoline-1 [cavéoles]). Les récepteur(s) de reconnaissance de la CPS au niveau des radeaux lipidiques (rIRc) sont probablement impliqués dans cette étape. **(3)** D'autres éléments exposés sur la paroi bactérienne pourraient conduire à l'internalisation bactérienne via l'endocytose dépendante de la clathrine grâce à un récepteur de liaison inconnu (cRc). **(4)** Comme l'inhibition totale de l'internalisation n'a pas pu être observée avec les inhibiteurs de ces deux voies, d'autres mécanismes d'endocytose compensatoires sont probablement impliqués. **(5)** Une fois internalisée, GBS encapsulé réside dans des phagosomes LAMP-1+ et survit pendant au moins 6 heures. Ces phagosomes pourraient éventuellement subir une maturation et la fusion avec des lysosomes **(5a)**. Il reste aussi l'hypothèse que les interactions régulées par la CPS avec les radeaux lipidiques pourraient favoriser la survie de GBS **(5b)**. **(6a)** L'internalisation de GBS est requise pour la production par les DCs d'IL-12p70, d'IL-23, d'IL-10 et CXCL10. Mise à part CXCL10, ces cytokines sont dépendantes de la voie des TLRs/MyD88. Tel que rapporté par Mancuso *et al.* (2009), la reconnaissance par des récepteurs intracellulaires (IntRc), dont TLR7 et TLR9, dans les phagolysosomes des DCs se traduit par la production d'IFN- α/β . **(6b)** Le récepteur intracellulaire cytosolique NLRP3 participe également à la reconnaissance de GBS et la production de cytokines. La boucle autocrine-paracrine des IFNs de type I pourrait être impliquée dans la production de cytokines, en particulier de la chimiokine CXCL10. Enfin, les résultats avec le mutant non encapsulé ont montré que la CPS n'inhibe pas la production de cytokines, bien au contraire, une souche bien encapsulée est requise pour une activation optimale des DCs, à l'exception d'IL-10 et d'IL-23 (comme indiqué par ↓). **(7)** Les études avec la CPS purifiée ont montré que ce composant induit la production de CCL2 par une voie TLR/MyD88 indépendante mais partiellement dépendante de la cavéoline-1; et la production de CCL3 par une voie partiellement dépendante de TLR2/MyD88.

Abbréviations : CCL, *chemokine ligand*; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité; CPS, capsule polysaccharidique; CXCL, *chemokine CXC motif ligand*; DC, cellules dendritique; GBC, antigène du Groupe B; GBS, *Streptococcus* du Groupe B; IFN, interféron; IL, interleukine; MyD88, *myeloid differentiation primary response 88*; NLRP3, *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*; TLR, récepteur de type Toll; TNF, *tumor necrosis factor*.

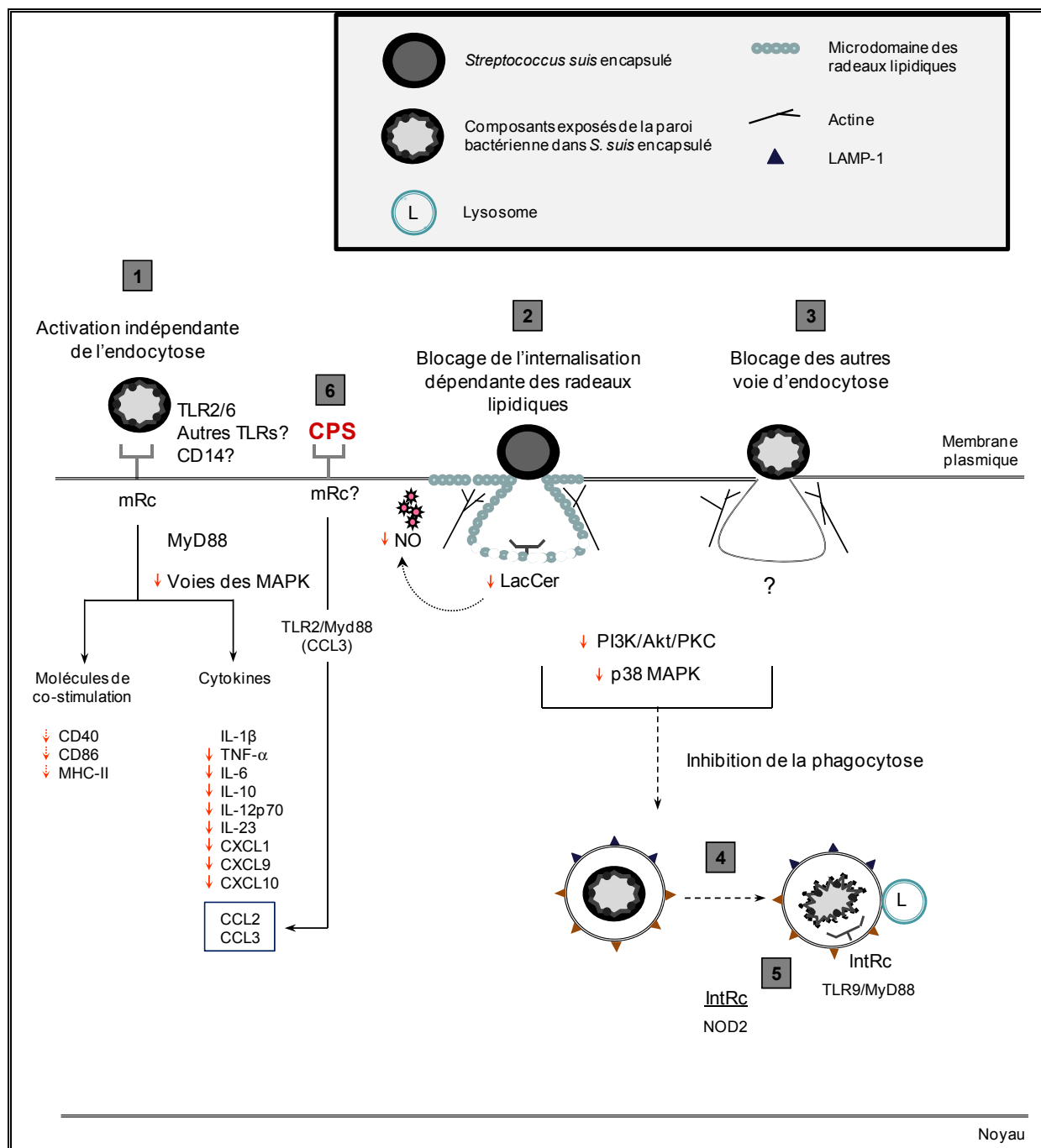


Figure 35. Modèle proposé des interactions entre *S. suis* de type 2 et les DCs

(1) *S. suis* encapsulé interagit avec plusieurs récepteurs membranaires (mRc) et induit la maturation des DCs (expression de CD40, CD86 et CMH-II) ainsi que la production de plusieurs cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-23, CXCL1, CXCL9, CXCL10, et CCL2) par l'intermédiaire d'un mécanisme indépendant de l'endocytose. Cette activation initiale des DCs en contact avec *S. suis* serait régulée par les composants de la paroi bactérienne, et principalement

via TLR2/6. D'autres TLRs ainsi que CD14 pourraient également être impliqués. MyD88 et MAPKs font partie de la plate-forme de signalisation impliquée dans des événements suite à l'activation par *S. suis*. **(2)** La présence de la CPS empêche la phagocytose de *S. suis* à travers la déstabilisation de microdomaines lipidiques, ce qui empêche l'accumulation de LacCer aux points d'interaction entre *S. suis* et la membrane plasmique. La présence de la CPS inhibe aussi des voies de signalisation, y compris la production de NO. **(3)** Le blocage des autres mécanismes d'endocytose ne peut pas être exclu et reste à élucider. **(4)** Si *S. suis* ne peut éviter l'internalisation, il sera rapidement et efficacement tué par les DCs lors de l'ingestion. Finalement, les résultats avec le mutant non encapsulé ont montré que la CPS inhibe considérablement non seulement les voies de signalisation, mais aussi la production de la plupart des cytokines par les DCs infectées (comme indiqué par ↓). L'expression des molécules de co-stimulation par les DCs semble également être affectée par la présence de CPS (comme indiqué par un pointillé ↓). **(5)** Malgré que *S. suis* soit faiblement phagocyté par les DCs, le faible nombre de bactéries internalisées et dégradées ou l'ingestion de composants de *S. suis* morts semble suffisant pour être reconnu par des récepteurs intracellulaires (IntRc) phagolysosomales ou cytosoliques, tels que la voie TLR9/MyD88 et le récepteur NOD2. **(6)** Les études avec la CPS purifiée ont montré que ce composant induit la production de CCL2 par une voie TLR/MyD88 indépendante; et la production de CCL3 par une voie partiellement dépendante de TLR2/MyD88.

Abbreviations : CCL, *chemokine ligand*; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité; CPS, capsule polysaccharidique; CXCL, *chemokine CXC motif ligand*; DC, cellules dendritique; IFN, interferon; IL, interleukine; LacCer, lactosylcéramide; MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; MyD88, *myeloid differentiation primary response 88*; NO, oxyde nitrique; NOD2, *nucleotide-binding and oligomerization domain 2*; TLR, récepteur de type Toll; TNF, *tumor necrosis factor*.

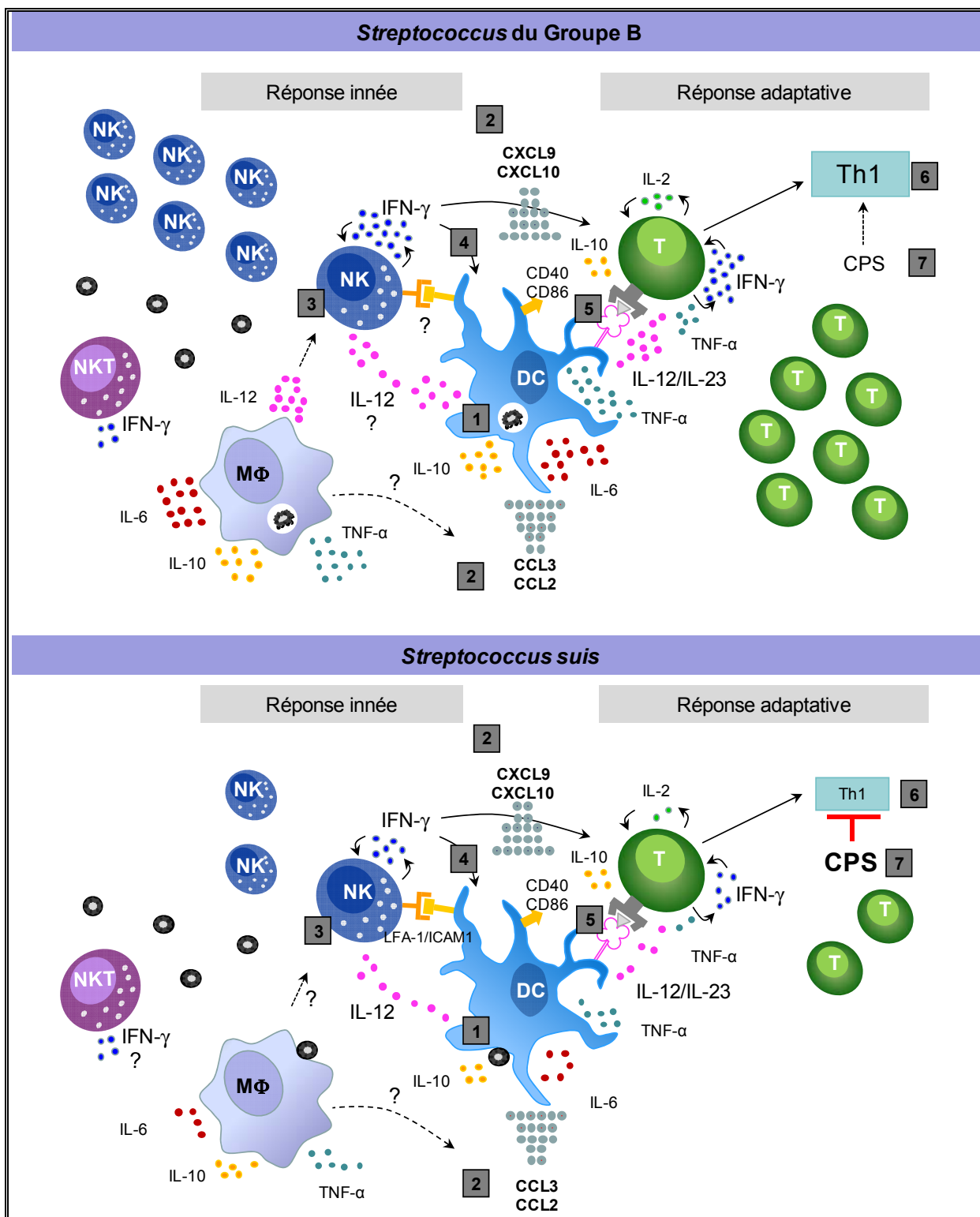


Figure 36. Modèle proposé de l'importance des DCs dans l'activation des cellules NK ainsi que dans la réponse innée suite à une infection par des streptocoques encapsulés

(1) La reconnaissance de GBS ou *S. suis* par les DCs ou APCs naïves induit la sécrétion de diverses cytokines et l'expression de molécules de co-stimulation. (2) La production de chimiokines par les APCs attire rapidement les lymphocytes, plus particulièrement les cellules NK au site d'infection. (3) Le contact direct et l'action des facteurs solubles, tels que les cytokines, entre les DCs les cellules NK naïves résultent à l'activation rapide des cellules NK. D'autres APCs pourraient aussi participer à cette activation tels que les macrophages (4) Les interactions bidirectionnelles entre les DCs et les cellules NK permettent une optimisation de leur activation respective et l'augmentation de la sécrétion de chimiokines pour l'attraction d'autres cellules NK et ainsi que d'autres lymphocytes, plus particulièrement les cellules T. (5) L'activation des cellules T par des facteurs solubles et/ou par l'interaction directe avec les DCs (molécules de co-stimulation et présentation de l'antigène via le CMH de classe II) amène une production d'IFN- γ par les cellules T. (6) Ces processus résultent au développement d'une réponse Th1. (7) Dans le contexte d'infection à GBS, la CPS n'inhibe pas l'activation des APCs et, par conséquent, non plus l'activation des cellules T (ni l'activation des cellules NK). En effet, la présence de la CPS semblerait nécessaire à la persistance de la bactérie et ceci mène à une activation très forte de l'immunité innée et l'immunité adaptative. Dans le contexte d'infection à *S. suis*, la CPS inhibe grandement l'activation des toutes les cellules du système immunitaire, ce qui en résulte à une réponse Th1 faible. *S. suis* pourrait donc avoir un effet immunosuppresseur sur la réponse immunitaire.

Abréviations : APC, cellule présentatrice d'antigène; CCL, *chemokine ligand*; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité; CPS, capsule polysaccharidique; CXCL, *chemokine CXC motif ligand*; IFN, interféron; M Φ : macrophage; NK: cellules natural killer; NKT: cellules natural killer T; T: cellules T; Th1: réponse T *helper* de type 1; TNF, *tumor necrosis factor*.

V – CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

Conclusions générales

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons établi les observations suivantes :

- Nos modèles d'infection *in vitro* avec des DCs et/ou des cellules NK d'origine murine sont de bons modèles d'étude et sont utiles pour la caractérisation des interactions entre les DCs et GBS ou *S. suis*, ainsi que de l'effet des DCs sur l'activation d'autres cellules immunitaires, telles que les cellules NK. Ces modèles nous ont permis d'observer que ces deux pathogènes agissent différemment avec ces cellules.
- GBS est grandement internalisé par les DCs via de multiples voies d'endocytose et résiste bien aux actions bactéricides intracellulaires des DCs. Parmi les voies d'endocytose, se trouvent entre autres la voie dépendante des radeaux lipidiques et la voie dépendante de la clathrine. L'activation des DCs par GBS nécessite la présence de récepteurs extracellulaires et intracellulaires dont les TLRs. Cette reconnaissance favorise la production de diverses cytokines et chimiokines ainsi que l'expression de molécules de co-stimulation. L'activation des DCs par GBS est importante pour l'activation subséquente des cellules NK, et ce, essentiellement par un contact direct entre les deux cellules.
- *S. suis* est faiblement internalisé par les DCs et résiste peu aux actions bactéricides intracellulaires des DCs. La reconnaissance de *S. suis* via divers récepteurs, principalement extracellulaires, favorise la production de plusieurs cytokines et chimiokines ainsi que l'expression de molécules de co-stimulation. L'activation des DCs par *S. suis* est importante pour l'activation subséquente des cellules NK, et ce, essentiellement par un contact direct via LFA-1 sur les cellules NK et la présence d'IL-12 produite par les DCs.
- Notre modèle d'infection *in vivo*, nous a permis de déterminer que les cellules NK sont les premières cellules impliquées dans la réponse innée face à GBS ou à *S. suis*, et ce, par leur production d'IFN- γ .

- GBS est un plus grand activateur des DCs et des cellules NK que *S. suis*. La CPS de *S. suis* empêche une activation optimale des DCs et des cellules NK alors que c'est l'opposé pour la CPS de GBS.
- Les interactions entre les DCs et les cellules NK pourraient jouer un rôle important dans le développement d'une réponse Th1 face à GBS ou à *S. suis*, en modulant les fonctions des cellules T CD4+.

Perspectives

Les prochaines étapes pour cette recherche incluent :

Dans des études *in vitro*

- L'étude de l'effet des voies d'endocytose empruntées par GBS sur l'activation globale des DCs. En particulier, l'effet de ces voies d'endocytose sur la présentation antigénique et l'activation subséquente des cellules T.
- Poursuivre la caractérisation des interactions entre les DCs et les cellules NK au niveau des cytokines (IL-15/IL-18) et des ligands/récepteurs impliqués lors d'une infection à GBS ou à *S. suis*. Il serait intéressant aussi d'étudier davantage l'impact rétroactif de l'activation des cellules NK sur les DCs (au niveau de l'expression de molécules de co-stimulation ou de molécules du CMH de classe II, entre autres).
- Poursuivre également la recherche sur les récepteurs impliqués dans la reconnaissance de GBS ou de *S. suis* par les DCs dont les CLR et les Siglecs.
- Mettre au point des tri-cultures de DCs et de cellules NK avec les cellules T pour évaluer la capacité des cellules NK à activer directement les cellules T ou indirectement par les DCs lors d'une infection à GBS ou à *S. suis*.
- Créer un nouvel outil d'étude pour la CPS avec l'utilisation de billes enrobées de CPSs purifiées pour déterminer le rôle activateur ou suppresseur des CPSs de GBS ou de *S. suis* dans les interactions avec les DCs, entre autre. L'utilisation de

CPSs purifiées avec des modifications chimiques (absence de l'acide sialique, par exemple) permettrait de caractériser le rôle de la structure et la composition des CPSs dans la modulation de la réponse immunitaire.

Dans des études *in vivo*

- Le développement d'un modèle *in vivo* par déplétion de cellules NK pour étudier l'importance des cellules NK dans la réponse immunitaire lors de la phase aiguë d'une infection à GBS ou à *S. suis*. Plus particulièrement, il serait intéressant d'étudier les différences entre la souche chinoise hypervirulente et des souches européennes de *S. suis*.

VI – BIBLIOGRAPHIE

1. **Le Doare K, Heath PT.** 2013. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine* **31**:D7-12.
2. **Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M.** 2010. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol* **5**:371-391.
3. **Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M.** 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol* **7**:259-279.
4. **Gottschalk M, Segura M, Xu J.** 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim Health Res Rev* **8**:29-45.
5. **Maisey HC, Doran KS, Nizet V.** 2008. Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert Rev Mol Med* **10**:e27.
6. **Edwards MS, Baker CJ.** 2005. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* **41**:839-847.
7. **Koenig JM, Keenan WJ.** 2009. Group B *Streptococcus* and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr Clin North Am* **56**:689-708.
8. **Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, et al.** 2005. Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides. *Infect Immun* **73**:3096-3103.
9. **Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, Segura M, Gottschalk M.** 2014. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg Microbes Infect* **3**:e45.
10. **Kerdsin A, Oishi K, Sripakdee S, Boonkerd N, Polwichai P, et al.** 2009. Clonal dissemination of human isolates of *Streptococcus suis* serotype 14 in Thailand. *J Med Microbiol* **58**:1508-1513.
11. **Crocker PR, Varki A.** 2001. Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol* **22**:337-342.
12. **Cress BF, Englaender JA, He W, Kasper D, Linhardt RJ, et al.** 2014. Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *FEMS Microbiol Rev* **38**:660-697.
13. **Severi E, Hood DW, Thomas GH.** 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology* **153**:2817-2822.
14. **Roberts IS.** 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**:285-315.
15. **Chaffin DO, Mentele LM, Rubens CE.** 2005. Sialylation of group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression. *J Bacteriol* **187**:4615-4626.
16. **Van Calsteren MR, Gagnon F, Calzas C, Goyette-Desjardins G, Okura M, et al.** 2013. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 14 capsular polysaccharide. *Biochem Cell Biol* **91**:49-58.
17. **Van Calsteren MR, Gagnon F, Lacouture S, Fittipaldi N, Gottschalk M.** 2010. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide. *Biochem Cell Biol* **88**:513-525.
18. **Segura MA, Cleroux P, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**:189-195.
19. **Littmann M, Albiger B, Frentzen A, Normark S, Henriques-Normark B, et al.** 2009. *Streptococcus pneumoniae* evades human dendritic cell surveillance by pneumolysin expression. *EMBO Mol Med* **1**:211-222.

20. **Colino J, Snapper CM.** 2003. Two distinct mechanisms for induction of dendritic cell apoptosis in response to intact *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* **171**:2354-2365.
21. **Noske N, Kammerer U, Rohde M, Hammerschmidt S.** 2009. Pneumococcal interaction with human dendritic cells: phagocytosis, survival, and induced adaptive immune response are manipulated by PavA. *J Immunol* **183**:1952-1963.
22. **Colino J, Shen Y, Snapper CM.** 2002. Dendritic cells pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses in vivo through distinct mechanisms. *J Exp Med* **195**:1-13.
23. **Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E.** 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* **106**:2252-2258.
24. **Degli-Esposti MA, Smyth MJ.** 2005. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* **5**:112-124.
25. **Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L.** 2008. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ* **15**:226-233.
26. **Newman KC, Riley EM.** 2007. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol* **7**:279-291.
27. **Nocard N, Mollereau R.** 1887. Sur une mammite contagieuse des vaches laitières. *Ann Inst Pasteur* **1**:109-126.
28. **Larsen JW, Sever JL.** 2008. Group B Streptococcus and pregnancy: a review. *Am J Obstet Gynecol* **198**:440-450.
29. **Muller AE, Oostvogel PM, Steegers EA, Dorr PJ.** 2006. Morbidity related to maternal group B streptococcal infections. *Acta Obstet Gynecol Scand* **85**:1027-1037.
30. **McCracken GH, Jr.** 1973. Group B streptococci: the new challenge in neonatal infections. *J Pediatr* **82**:703-706.
31. **Nandyal RR.** 2008. Update on group B streptococcal infections: perinatal and neonatal periods. *J Perinat Neonatal Nurs* **22**:230-237.
32. **Wennekamp J, Henneke P.** 2008. Induction and termination of inflammatory signaling in group B streptococcal sepsis. *Immunol Rev* **225**:114-127.
33. **Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, et al.** 2008. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA* **299**:2056-2065.
34. **De Francesco MA, Gargiulo F, Negrini R, Gelmi M, Manca N.** 2008. Different sequence strains of *Streptococcus agalactiae* elicit various levels of cytokine production. *Immunol Invest* **37**:741-751.
35. **Tyrrell GJ, Senzilet LD, Spika JS, Kertesz DA, Alagaratnam M, et al.** 2000. Invasive disease due to group B streptococcal infection in adults: results from a Canadian, population-based, active laboratory surveillance study--1996. Sentinel Health Unit Surveillance System Site Coordinators. *J Infect Dis* **182**:168-173.
36. **Sendi P, Johansson L, Norrby-Teglund A.** 2008. Invasive group B Streptococcal disease in non-pregnant adults : a review with emphasis on skin and soft-tissue infections. *Infection* **36**:100-111.
37. **Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL.** 2007. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. *J Clin Microbiol* **45**:2929-2936.
38. **Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, Kliucinskas M, Maleckiene L, et al.** 2008. Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstet Gynecol Scand* **87**:260-271.

39. **Schwartz B, Schuchat A, Oxtoby MJ, Cochi SL, Hightower A, et al.** 1991. Invasive group B streptococcal disease in adults. A population-based study in metropolitan Atlanta. *JAMA* **266**:1112-1114.
40. **Teatero S, McGeer A, Low DE, Li A, Demczuk W, et al.** 2014. Characterization of invasive Group B *Streptococcus* strains from the greater Toronto area, Canada. *J Clin Microbiol* **52**:1441-1447.
41. **Schuchat A.** 1998. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* **11**:497-513.
42. **Chaudhuri K, Gonzales J, Jesurun CA, Ambat MT, Mandal-Chaudhuri S.** 2008. Anaphylactic shock in pregnancy: a case study and review of the literature. *Int J Obstet Anesth* **17**:350-357.
43. **Mason KL, Rogers LM, Soares EM, Bani-Hashemi T, Erb Downward J, et al.** 2013. Intrauterine Group A streptococcal infections are exacerbated by prostaglandin E2. *J Immunol* **191**:2457-2465.
44. **Dermer P, Lee C, Eggert J, Few B.** 2004. A history of neonatal group B streptococcus with its related morbidity and mortality rates in the United States. *J Pediatr Nurs* **19**:357-363.
45. **Shet A, Ferrieri P.** 2004. Neonatal & maternal group B streptococcal infections: a comprehensive review. *Indian J Med Res* **120**:141-150.
46. **Doran KS, Nizet V.** 2004. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Mol Microbiol* **54**:23-31.
47. **Dessi A, Crisafulli M, Accossu S, Setzu V, Fanos V.** 2008. Osteo-articular infections in newborns: diagnosis and treatment. *J Chemother* **20**:542-550.
48. **Henning KJ, Hall EL, Dwyer DM, Billmann L, Schuchat A, et al.** 2001. Invasive group B streptococcal disease in Maryland nursing home residents. *J Infect Dis* **183**:1138-1142.
49. **Marti A, Marcos A, Martinez JA.** 2001. Obesity and immune function relationships. *Obes Rev* **2**:131-140.
50. **Trivalle C, Martin E, Martel P, Jacque B, Menard JF, et al.** 1998. Group B streptococcal bacteraemia in the elderly. *J Med Microbiol* **47**:649-652.
51. **Lemire P, Houde M, Lecours MP, Fittipaldi N, Segura M.** 2012. Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells. *Microbes Infect* **14**:1064-1076.
52. **Tamura GS, Kuypers JM, Smith S, Raff H, Rubens CE.** 1994. Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infect Immun* **62**:2450-2458.
53. **Poyart C, Lamy MC, Boumaila C, Fiedler F, Trieu-Cuot P.** 2001. Regulation of D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis in *Streptococcus agalactiae* involves a novel two-component regulatory system. *J Bacteriol* **183**:6324-6234.
54. **Lewis AL, Hensler ME, Varki A, Nizet V.** 2006. The group B streptococcal sialic acid O-acetyltransferase is encoded by neuD, a conserved component of bacterial sialic acid biosynthetic gene clusters. *J Biol Chem* **281**:11186-11192.
55. **Guttormsen HK, Paoletti LC, Mansfield KG, Jachymek W, Jennings HJ, et al.** 2008. Rational chemical design of the carbohydrate in a glycoconjugate vaccine enhances IgM-to-IgG switching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:5903-5908.
56. **Wessels MR, Rubens CE, Benedi VJ, Kasper DL.** 1989. Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:8983-8987.
57. **Maruvada R, Blom AM, Prasadara NV.** 2008. Effects of complement regulators bound to *Escherichia coli* K1 and Group B *Streptococcus* on the interaction with host cells. *Immunology* **124**:265-276.

58. **Buscetta M, Papasergi S, Firon A, Pietrocola G, Biondo C, et al.** 2014. FbsC, a novel fibrinogen-binding protein, promotes *Streptococcus agalactiae*-host cell interactions. *J Biol Chem*:In press.
59. **Faralla C, Metruccio MM, De Chiara M, Mu R, Patras KA, et al.** 2014. Analysis of two-component systems in group B *Streptococcus* shows that RgfAC and the novel FspSR modulate virulence and bacterial fitness. *MBio* **5**:e00870-00814.
60. **Mattsson E, Verhage L, Rollof J, Fleer A, Verhoef J, et al.** 1993. Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and interleukin-6. *FEMS Immunol Med Microbiol* **7**:281-287.
61. **Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiemermann C.** 1998. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J Exp Med* **188**:305-315.
62. **Nizet V.** 2002. Streptococcal beta-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends Microbiol* **10**:575-580.
63. **Molloy EM, Cotter PD, Hill C, Mitchell DA, Ross RP.** 2011. Streptolysin S-like virulence factors: the continuing sagA. *Nat Rev Microbiol* **9**:670-681.
64. **Herbert MA, Beveridge CJ, Saunders NJ.** 2004. Bacterial virulence factors in neonatal sepsis: group B streptococcus. *Curr Opin Infect Dis* **17**:225-229.
65. **Wang Z, Guo C, Xu Y, Liu G, Lu C, et al.** 2014. Two novel functions of hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae* are enhanced intracellular survival and inhibition of proinflammatory cytokine expression. *Infect Immun* **82**:2615-2625.
66. **T. S, A. S, A. M.** 2001. Bacterial proteases: current therapeutic use and future prospects for the development of new antibiotics. *Expert Opin. Ther. Pat.* **36**:327-335.
67. **Bohnsack JF, Zhou XN, Williams PA, Cleary PP, Parker CJ, et al.** 1991. Purification of the proteinase from group B streptococci that inactivates human C5a. *Biochim Biophys Acta* **1079**:222-228.
68. **Adderson EE, Takahashi S, Wang Y, Armstrong J, Miller DV, et al.** 2003. Subtractive hybridization identifies a novel predicted protein mediating epithelial cell invasion by virulent serotype III group B *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* **71**:6857-6863.
69. **Tenenbaum T, Spellerberg B, Adam R, Vogel M, Kim KS, et al.** 2007. *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. *Microbes Infect* **9**:714-720.
70. **Lauer P, Rinaudo CD, Soriani M, Margarit I, Maione D, et al.** 2005. Genome analysis reveals pili in Group B *Streptococcus*. *Science* **309**:105.
71. **Maisey HC, Quach D, Hensler ME, Liu GY, Gallo RL, et al.** 2008. A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence. *FASEB J* **22**:1715-1724.
72. **Rosenau A, Martins K, Amor S, Gannier F, Lanotte P, et al.** 2007. Evaluation of the ability of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from genital and neonatal specimens to bind to human fibrinogen and correlation with characteristics of the fbsA and fbsB genes. *Infect Immun* **75**:1310-1317.
73. **Samen U, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ, Borges F.** 2007. The surface protein Srr-1 of *Streptococcus agalactiae* binds human keratin 4 and promotes adherence to epithelial HEp-2 cells. *Infect Immun* **75**:5405-5414.
74. **Tazi A, Disson O, Bellais S, Bouaboud A, Dmytruk N, et al.** 2010. The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *J Exp Med* **207**:2313-2322.

75. **Tazi A, Bellais S, Tardieux I, Dramsi S, Trieu-Cuot P, et al.** 2012. Group B *Streptococcus* surface proteins as major determinants for meningeal tropism. *Curr Opin Microbiol* **15**:44-49.
76. **Poyart C, Pellegrini E, Gaillot O, Boumaila C, Baptista M, et al.** 2001. Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* **69**:5098-5106.
77. **Hamilton A, Popham DL, Carl DJ, Lauth X, Nizet V, et al.** 2006. Penicillin-binding protein 1a promotes resistance of Group B *Streptococcus* to antimicrobial peptides. *Infect Immun* **74**:6179-6187.
78. **Jones AL, Needham RH, Clancy A, Knoll KM, Rubens CE.** 2003. Penicillin-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*: a novel mechanism for evasion of immune clearance. *Mol Microbiol* **47**:247-256.
79. **Cotter PA, Miller JF.** 1998. In vivo and ex vivo regulation of bacterial virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol* **1**:17-26.
80. **Bodaszewska-Lubas M, Brzychczy-Wloch M, Adamski P, Gosiewski T, Strus M, et al.** 2013. Adherence of group B streptococci to human rectal and vaginal epithelial cell lines in relation to capsular polysaccharides as well as alpha-like protein genes - pilot study. *Pol J Microbiol* **62**:85-90.
81. **Soriani M, Santi I, Taddei A, Rappuoli R, Grandi G, et al.** 2006. Group B *Streptococcus* crosses human epithelial cells by a paracellular route. *J Infect Dis* **193**:241-250.
82. **Tamura GS, Nittayajarn A.** 2000. Group B streptococci and other gram-positive cocci bind to cytokeratin 8. *Infect Immun* **68**:2129-2134.
83. **Wang NY, Patras KA, Seo HS, Cavaco CK, Rosler B, et al.** 2014. Group B Streptococcal Serine-Rich Repeat Proteins Promote Interaction with Fibrinogen and Vaginal Colonization. *J Infect Dis*:In press.
84. **Baron MJ, Filman DJ, Prophete GA, Hogle JM, Madoff LC.** 2007. Identification of a glycosaminoglycan binding region of the alpha C protein that mediates entry of group B *Streptococci* into host cells. *J Biol Chem* **282**:10526-10536.
85. **Dumenil G, Nassif X.** 2005. Extracellular bacterial pathogens and small GTPases of the Rho family: an unexpected combination. *Curr Top Microbiol Immunol* **291**:11-28.
86. **Winram SB, Jonas M, Chi E, Rubens CE.** 1998. Characterization of group B streptococcal invasion of human chorion and amnion epithelial cells In vitro. *Infect Immun* **66**:4932-4941.
87. **Randis TM, Gelber SE, Hooven TA, Abellar RG, Akabas LH, et al.** 2014. Group B *Streptococcus* beta-hemolysin/Cytolysin Breaches Maternal-Fetal Barriers to Cause Preterm Birth and Intrauterine Fetal Demise in Vivo. *J Infect Dis* **210**:265-273.
88. **Nizet V, Gibson RL, Chi EY, Framson PE, Hulse M, et al.** 1996. Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect Immun* **64**:3818-3826.
89. **Campbell JR, Baker CJ, Edwards MS.** 1991. Deposition and degradation of C3 on type III group B streptococci. *Infect Immun* **59**:1978-1983.
90. **Marques MB, Kasper DL, Pangburn MK, Wessels MR.** 1992. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infect Immun* **60**:3986-3993.
91. **Pozdnyakova O, Guttormsen HK, Lalani FN, Carroll MC, Kasper DL.** 2003. Impaired antibody response to group B streptococcal type III capsular polysaccharide in C3- and complement receptor 2-deficient mice. *J Immunol* **170**:84-90.

92. **Lewis AL, Cao H, Patel SK, Diaz S, Ryan W, et al.** 2007. NeuA sialic acid O-acetyltransferase activity modulates O-acetylation of capsular polysaccharide in group B *Streptococcus*. *J Biol Chem* **282**:27562-27571.
93. **Jarva H, Hellwage J, Jokiranta TS, Lehtinen MJ, Zipfel PF, et al.** 2004. The group B streptococcal beta and pneumococcal Hic proteins are structurally related immune evasion molecules that bind the complement inhibitor factor H in an analogous fashion. *J Immunol* **172**:3111-3118.
94. **Valenti-Weigand P, Benkel P, Rohde M, Chhatwal GS.** 1996. Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages. *Infect Immun* **64**:2467-2473.
95. **Spellerberg B, Martin S, Brandt C, Luttkien R.** 2000. The *cyl* genes of *Streptococcus agalactiae* are involved in the production of pigment. *FEMS Microbiol Lett* **188**:125-128.
96. **Gallo RL, Nizet V.** 2003. Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease. *Curr Allergy Asthma Rep* **3**:402-409.
97. **Levy O, Jean-Jacques RM, Cywes C, Sisson RB, Zarembek KA, et al.** 2003. Critical role of the complement system in Group B *streptococcus*-induced tumor necrosis factor alpha release. *Infect Immun* **71**:6344-6353.
98. **Vallejo JG, Baker CJ, Edwards MS.** 1996. Interleukin-6 production by human neonatal monocytes stimulated by type III group B streptococci. *J Infect Dis* **174**:332-337.
99. **Ring A, Depnering C, Pohl J, Nizet V, Shenep JL, et al.** 2002. Synergistic action of nitric oxide release from murine macrophages caused by group B streptococcal cell wall and beta-hemolysin/cytolysin. *J Infect Dis* **186**:1518-1521.
100. **Hensler ME, Miyamoto S, Nizet V.** 2008. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin directly impairs cardiomyocyte viability and function. *PLoS ONE* **3**:e2446.
101. **Nizet V, Kim KS, Stins M, Jonas M, Chi EY, et al.** 1997. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. *Infect Immun* **65**:5074-5081.
102. **Alkuwaity K, Taylor A, Heckels JE, Doran KS, Christodoulides M.** 2012. Group B *Streptococcus* interactions with human meningeal cells and astrocytes in vitro. *PLoS ONE* **7**:e42660.
103. **Jansen EJ, Van Dorssen CA.** 1951. Meningoencephalitis bij varkens door streptococci. *Tijdschr Diergeneesk* **76**:815-832.
104. **Field HI, Buntain D, Done JT.** 1954. Studies on pig mortality. I. Streptococcal meningitis and arthritis. *Vet. Rec.* **66**:453-455.
105. **Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultz C.** 2009. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clin Infect Dis* **48**:617-625.
106. **Elliott SD.** 1966. Streptococcal infection in young pigs. I. An immunochemical study of the causative agent (PM streptococcus). *J Hyg (Lond)* **64**:205-212.
107. **Kilpper-Balz R, Shleifer KH.** 1987. *Streptococcus suis* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**.
108. **Perch B, Kristjansen P, Skadhauge K.** 1968. Group R streptococci pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. *Acta Pathol Microbiol Scand* **74**:69-76.
109. **Zhu F, Yang H, Hu X, Wang H, Wang G, et al.** 2000. [Homogeneity study on the *Streptococcus suis* isolated from human and swine]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* **21**:427-429.
110. **Yu H, Jing H, Chen Z, Zheng H, Zhu X, et al.** 2006. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis* **12**:914-920.

111. **Tang J, Wang C, Feng Y, Yang W, Song H, et al.** 2006. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med* **3**:e151.
112. **Ye C, Zhu X, Jing H, Du H, Segura M, et al.** 2006. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis* **12**:1203-1208.
113. **Higgins R, Gottschalk M.** 2006. Streptococcal Diseases, p. 769-783. *In* Straw BE, D'Allaire S, W.L. M (ed.), *Diseases of swine*, Ames, IA: Iowa State University Press
114. **Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, et al.** 2005. Biochemical analysis, *cpn60* and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol* **107**:63-69.
115. **Chatellier S, Harel J, Zhang Y, Gottschalk M, Higgins R, et al.** 1998. Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 2**:581-589.
116. **Perch B, Pedersen KB, Henrichsen J.** 1983. Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* **17**:993-996.
117. **Berthelot-Herault F, Morvan H, Keribin AM, Gottschalk M, Kobisch M.** 2000. Production of muraminidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and suliyisin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Vet Res* **31**:473-479.
118. **Wisselink HJ, Smith HE, Stockhofe-Zurwieden N, Peperkamp K, Vecht U.** 2000. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Vet Microbiol* **74**:237-248.
119. **Takamatsu D, Wongsawan K, Osaki M, Nishino H, Ishiji T, et al.** 2008. *Streptococcus suis* in humans, Thailand. *Emerg Infect Dis* **14**:181-183.
120. **Kataoka Y, Sugimoto C, Nakazawa M, Morozumi T, Kashiwazaki M.** 1993. The epidemiological studies of *Streptococcus suis* infections in Japan from 1987 to 1991. *J Vet Med Sci* **55**:623-626.
121. **Fittipaldi N, Fuller TE, Teel JF, Wilson TL, Wolfram TJ, et al.** 2009. Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and suliyisin by field strains of *Streptococcus suis* isolated in the United States. *Vet Microbiol* **139**:310-317.
122. **Hommeze J, Wullepit J, Cassimon P, Castryck F, Ceyssens K, et al.** 1988. *Streptococcus suis* and other streptococcal species as a cause of extramammary infection in ruminants. *Vet Rec* **123**:626-627.
123. **Devriese LA, Sustronck B, Maenhout T, Haesebrouck F.** 1990. *Streptococcus suis* meningitis in a horse. *Vet Rec* **127**:68.
124. **Salasia SI, Lammler C, Devriese LA.** 1994. Serotypes and putative virulence markers of *Streptococcus suis* isolates from cats and dogs. *Res Vet Sci* **57**:259-261.
125. **MacInnes JI, Desrosiers R.** 1999. Agents of the "suis-ide diseases" of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*. *Can J Vet Res* **63**:83-89.
126. **Fittipaldi N, Sekizaki T, Takamatsu D, de la Cruz Dominguez-Punaro M, Harel J, et al.** 2008. Significant contribution of the *pgdA* gene to the virulence of *Streptococcus suis*. *Mol Microbiol* **70**:1120-1135.
127. **Zheng P, Zhao YX, Zhang AD, Kang C, Chen HC, et al.** 2009. Pathologic analysis of the brain from *Streptococcus suis* type 2 experimentally infected pigs. *Vet Pathol* **46**:531-535.
128. **Reams RY, Glickman LT, Harrington DD, Thacker HL, Bowersock TL.** 1994. *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II.

- Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. *J Vet Diagn Invest* **6**:326-334.
129. **Schmitt CS, Halbur PG, Roth JA, Kinyon JM, Kasorndorkbua C, et al.** 2001. Influence of ampicillin, ceftiofur, attenuated live PRRSV vaccine, and reduced dose *Streptococcus suis* exposure on disease associated with PRRSV and *S. suis* coinfection. *Vet Microbiol* **78**:29-37.
 130. **Pallares FJ, Halbur PG, Opriessnig T, Sorden SD, Villar D, et al.** 2002. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Vet Diagn Invest* **14**:515-519.
 131. **Cloutier G, D'Allaire S, Martinez G, Surprenant C, Lacouture S, et al.** 2003. Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. *Vet Microbiol* **97**:135-151.
 132. **Robertson ID, Blackmore DK.** 1989. Prevalence of *Streptococcus suis* types 1 and 2 in domestic pigs in Australia and New Zealand. *Vet Rec* **124**:391-394.
 133. **Torremorell M, Pijoan C.** 1998. Prolonged persistence of an epidemic *Streptococcus suis* strain in a closed pig population. *Vet Rec* **143**:394-395.
 134. **Kataoka Y, Yoshida T, Sawada T.** 2000. A 10-year survey of antimicrobial susceptibility of *streptococcus suis* isolates from swine in Japan. *J Vet Med Sci* **62**:1053-1057.
 135. **Dee SA, Carlson AR, Winkelman NL, Corey MM.** 1993. Effect of management practices on the *Streptococcus suis* carrier rate in nursery swine. *J Am Vet Med Assoc* **203**:295-299.
 136. **Aarestrup FM, Jorsal SE, Jensen NE.** 1998. Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. *Vet Microbiol* **60**:59-66.
 137. **Huang YT, Teng LJ, Ho SW, Hsueh PR.** 2005. *Streptococcus suis* infection. *J Microbiol Immunol Infect* **38**:306-313.
 138. **Wertheim HF, Nguyen HN, Taylor W, Lien TT, Ngo HT, et al.** 2009. *Streptococcus suis*, an important cause of adult bacterial meningitis in northern Vietnam. *PLoS ONE* **4**:e5973.
 139. **Ip M, Fung KS, Chi F, Cheuk ES, Chau SS, et al.** 2007. *Streptococcus suis* in Hong Kong. *Diagn Microbiol Infect Dis* **57**:15-20.
 140. **Bahloul H, Mofredj A, Mrabet A, Gineyt G, Rousselier P.** 2008. [*Streptococcus suis* meningitis after oral contamination?]. *Med Mal Infect* **38**:281-282.
 141. **Fongcom A, Pruksakorn S, Mongkol R, Tharavichitkul P, Yoonim N.** 2001. *Streptococcus suis* infection in northern Thailand. *J Med Assoc Thai* **84**:1502-1508.
 142. **Mai NT, Hoa NT, Nga TV, Linh le D, Chau TT, et al.** 2008. *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam. *Clin Infect Dis* **46**:659-667.
 143. **Vanier G, Segura M, Friedl P, Lacouture S, Gottschalk M.** 2004. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **72**:1441-1449.
 144. **Hommeze J, Devriese LA, Henrichsen J, Castryck F.** 1986. Identification and characterization of *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* **11**:349-355.
 145. **Higgins R, Gottschalk M.** 1990. An update on *Streptococcus suis* identification. *J Vet Diagn Invest* **2**:249-252.
 146. **Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N, Tetenburg BJ, Wisselink HJ, Smith HE.** 1997. Murine and pig models of *Streptococcus suis* type 2 infections are incompatible. *Adv Exp Med Biol* **418**:827-829.
 147. **Berthelot-Herault F, Cariolet R, Labbe A, Gottschalk M, Cardinal JY, et al.** 2001. Experimental infection of specific pathogen free piglets with French strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res* **65**:196-200.

148. **Bonifait L, Charette SJ, Filion G, Gottschalk M, Grenier D.** 2011. Amoeba host model for evaluation of *Streptococcus suis* virulence. *Appl Environ Microbiol* **77**:6271-6273.
149. **Beaudoin M, Higgins R, Harel J, Gottschalk M.** 1992. Studies on a murine model for evaluation of virulence of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates. *FEMS Microbiol Lett* **78**:111-116.
150. **Berthelot-Herault F, Gottschalk M, Morvan H, Kobisch M.** 2005. Dilemma of virulence of *Streptococcus suis*: Canadian isolate 89-1591 characterized as a virulent strain using a standardized experimental model in pigs. *Can J Vet Res* **69**:236-240.
151. **Wichgers Schreur PJ, Rebel JM, Smits MA, van Putten JP, Smith HE.** 2010. Differential activation of the Toll-like receptor 2/6 complex by lipoproteins of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9. *Vet Microbiol* **143**:363-370.
152. **Du B, Ji W, An H, Shi Y, Huang Q, et al.** 2014. Functional analysis of c-di-AMP phosphodiesterase, GdpP, in *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbiol Res*:In press.
153. **Zhong Q, Zhao Y, Chen T, Yin S, Yao X, et al.** 2014. A functional peptidoglycan hydrolase characterized from T4SS in 89K pathogenicity island of epidemic *Streptococcus suis* serotype 2. *BMC Microbiol* **14**:73.
154. **Zhu H, Zhou J, Ni Y, Yu Z, Mao A, et al.** 2014. Contribution of eukaryotic-type serine/threonine kinase to stress response and virulence of *Streptococcus suis*. *PLoS ONE* **9**:e91971.
155. **Jacques M, Gottschalk M, Foiry B, Higgins R.** 1990. Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* **172**:2833-2838.
156. **Smith HE, Damman M, van der Velde J, Wagenaar F, Wisselink HJ, et al.** 1999. Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun* **67**:1750-1756.
157. **Okura M, Takamatsu D, Maruyama F, Nozawa T, Nakagawa I, et al.** 2013. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters from all serotypes of *Streptococcus suis*: potential mechanisms for generation of capsular variation. *Appl Environ Microbiol* **79**:2796-2806.
158. **Wang K, Fan W, Cai L, Huang B, Lu C.** 2011. Genetic analysis of the capsular polysaccharide synthesis locus in 15 *Streptococcus suis* serotypes. *FEMS Microbiol Lett* **324**:117-124.
159. **Charland N, Kellens JT, Caya F, Gottschalk M.** 1995. Agglutination of *Streptococcus suis* by sialic acid-binding lectins. *J Clin Microbiol* **33**:2220-2221.
160. **Smith HE, de Vries R, van't Slot R, Smits MA.** 2000. The cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: genetic determinant for the synthesis of sialic acid. *Microb Pathog* **29**:127-134.
161. **Charland N, Kobisch M, Martineau-Doize B, Jacques M, Gottschalk M.** 1996. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* **14**:195-203.
162. **Segura M, Gottschalk M, Olivier M.** 2004. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infect Immun* **72**:5322-5330.
163. **Fittipaldi N, Sekizaki T, Takamatsu D, Harel J, Dominguez-Punaro MD, et al.** 2008. D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Infection and Immunity* **76**:3587-3594.
164. **King SJ, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, et al.** 2001. Distribution and genetic diversity of sullysin in *Streptococcus suis* isolated from different diseases of

- pigs and characterization of the genetic basis of suilysin absence. *Infect Immun* **69**:7572-7582.
165. **Chabot-Roy G, Willson P, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M.** 2006. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microb Pathog* **41**:21-32.
 166. **Lalonde M, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M.** 2000. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology* **146** (Pt 8):1913-1921.
 167. **Segura M, Gottschalk M.** 2002. *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity. *Infect Immun* **70**:4312-4322.
 168. **Allen AG, Bolitho S, Lindsay H, Khan S, Bryant C, et al.** 2001. Generation and characterization of a defined mutant of *Streptococcus suis* lacking suilysin. *Infect Immun* **69**:2732-2735.
 169. **Lun S, Perez-Casal J, Connor W, Willson PJ.** 2003. Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microb Pathog* **34**:27-37.
 170. **Jobin MC, Brassard J, Quessy S, Gottschalk M, Grenier D.** 2004. Acquisition of host plasmin activity by the Swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **72**:606-610.
 171. **Wang K, Lu C.** 2007. Adhesion activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a Chinese *Streptococcus suis* type 2 strain. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **120**:207-209.
 172. **Quessy S, Busque P, Higgins R, Jacques M, Dubreuil JD.** 1997. Description of an albumin binding activity for *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Microbiol Lett* **147**:245-250.
 173. **Esgleas M, Li Y, Hancock MA, Harel J, Dubreuil JD, et al.** 2008. Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. *Microbiology* **154**:2668-2679.
 174. **Pancholi V.** 2001. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* **58**:902-920.
 175. **Akaike T, Okamoto T, Maeda H.** 2001. [Impairment of host defense via activation of host's proteases by bacterial proteases]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **46**:524-531.
 176. **Allen AG, Lindsay H, Seilly D, Bolitho S, Peters SE, et al.** 2004. Identification and characterisation of hyaluronate lyase from *Streptococcus suis*. *Microb Pathog* **36**:327-335.
 177. **Jobin MC, Grenier D.** 2003. Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* **220**:113-119.
 178. **Mentlein R.** 1999. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept* **85**:9-24.
 179. **Ge J, Feng Y, Ji H, Zhang H, Zheng F, et al.** 2009. Inactivation of dipeptidyl peptidase IV attenuates the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 that causes streptococcal toxic shock syndrome. *Curr Microbiol* **59**:248-255.
 180. **Bonifait L, Grenier D.** 2011. The SspA subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* triggers a pro-inflammatory response in macrophages through a non-proteolytic mechanism. *BMC Microbiol* **11**:47.
 181. **Fittipaldi N, Xu J, Lacouture S, Tharavichitkul P, Osaki M, et al.** 2011. Lineage and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from North America. *Emerg Infect Dis* **17**:2239-2244.
 182. **Zhang A, Mu X, Chen B, Liu C, Han L, et al.** 2010. Identification and characterization of IgA1 protease from *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* **140**:171-175.

183. **Spirig T, Weiner EM, Clubb RT.** 2011. Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **82**:1044-1059.
184. **Osaki M, Takamatsu D, Shimoji Y, Sekizaki T.** 2002. Characterization of *Streptococcus suis* genes encoding proteins homologous to sortase of gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **184**:971-982.
185. **Vanier G, Sekizaki T, Dominguez-Punaro MC, Esgleas M, Osaki M, et al.** 2008. Disruption of *srtA* gene in *Streptococcus suis* results in decreased interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins. *Vet Microbiol* **127**:417-424.
186. **Wang C, Li M, Feng Y, Zheng F, Dong Y, et al.** 2009. The involvement of sortase A in high virulence of STSS-causing *Streptococcus suis* serotype 2. *Arch Microbiol* **191**:23-33.
187. **Langford P, Williams AE, Kroll JS.** 1991. Superoxide dismutases of pathogenic and non-pathogenic *Streptococcus suis* type 2 isolates. *FEMS Microbiol Lett* **61**:347-350.
188. **Fontaine MC, Perez-Casal J, Willson PJ.** 2004. Investigation of a novel DNase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **72**:774-781.
189. **de Buhr N, Neumann A, Jerjomiceva N, von Kockritz-Blickwede M, Baums CG.** 2014. *Streptococcus suis* DNase SsnA contributes to degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) and evasion of NET-mediated antimicrobial activity. *Microbiology* **160**:385-395.
190. **Benga L, Goethe R, Rohde M, Valentin-Weigand P.** 2004. Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cell Microbiol* **6**:867-881.
191. **Wilson SM, Norton P, Haverson K, Leigh J, Bailey M.** 2007. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and cells of the myeloid lineage in the palatine tonsil of the pig. *Vet Immunol Immunopathol* **117**:116-123.
192. **Williams DM, Lawson GH, Rowland AC.** 1973. Streptococcal infection in piglets: the palatine tonsils as portals of entry for *Streptococcus suis*. *Res Vet Sci* **15**:352-362.
193. **Gottschalk M, Segura M.** 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* **76**:259-272.
194. **Esgleas M, Lacouture S, Gottschalk M.** 2005. *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol Lett* **244**:33-40.
195. **de Greeff A, Buys H, Verhaar R, Dijkstra J, van Alphen L, et al.** 2002. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **70**:1319-1325.
196. **Brassard J, Gottschalk M, Quessy S.** 2004. Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin. *Vet Microbiol* **102**:87-94.
197. **Zhang A, Mu X, Chen B, Han L, Chen H, et al.** 2011. IgA1 protease contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* **148**:436-439.
198. **Gottschalk M, Petitbois S, Higgins R, Jacques M.** 1991. Adherence of *Streptococcus suis* capsular type 2 to porcine lung sections. *Can J Vet Res* **55**:302-324.
199. **Wu T, Chang H, Tan C, Bei W, Chen H.** 2009. The orphan response regulator RevSC21 controls the attachment of *Streptococcus suis* serotype-2 to human laryngeal epithelial cells and the expression of virulence genes. *FEMS Microbiol Lett* **292**:170-181.
200. **Pan X, Ge J, Li M, Wu B, Wang C, et al.** 2009. The orphan response regulator CovR: a globally negative modulator of virulence in *Streptococcus suis* serotype 2. *J Bacteriol* **191**:2601-2612.

201. **Wang Y, Zhang W, Wu Z, Zhu X, Lu C.** 2011. Functional analysis of luxS in *Streptococcus suis* reveals a key role in biofilm formation and virulence. *Vet Microbiol* **152**:151-160.
202. **Grenier D, Grignon L, Gottschalk M.** 2009. Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate. *Vet J* **179**:292-295.
203. **Valentin-Weigand P.** 2004. Intracellular invasion and persistence: survival strategies of *Streptococcus suis* and *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **117**:459-463.
204. **Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144** (Pt 2):325-332.
205. **Andresen LO, Tegtmeier C.** 2001. Passive immunization of pigs against experimental infection with *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol* **81**:331-344.
206. **del Campo Sepulveda EM, Altman E, Kobisch M, D'Allaire S, Gottschalk M.** 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. *Vet Microbiol* **52**:113-125.
207. **Vanier G, Fittipaldi N, Slater JD, de la Cruz Dominguez-Punaro M, Rycroft AN, et al.** 2009. New putative virulence factors of *Streptococcus suis* involved in invasion of porcine brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog* **46**:13-20.
208. **Tang Y, Zhang X, Wu W, Lu Z, Fang W.** 2012. Inactivation of the *sodA* gene of *Streptococcus suis* type 2 encoding superoxide dismutase leads to reduced virulence to mice. *Vet Microbiol* **158**:360-366.
209. **Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J.** 2005. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit* **11**:RA76-85.
210. **Segura M, Vadeboncoeur N, Gottschalk M.** 2002. CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. *Clin Exp Immunol* **127**:243-254.
211. **Segura M, Stankova J, Gottschalk M.** 1999. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infect Immun* **67**:4646-4654.
212. **Dominguez-Punaro MC, Segura M, Plante MM, Lacouture S, Rivest S, et al.** 2007. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* **179**:1842-1854.
213. **Vanier G, Segura M, Lecours MP, Grenier D, Gottschalk M.** 2009. Porcine brain microvascular endothelial cell-derived interleukin-8 is first induced and then degraded by *Streptococcus suis*. *Microb Pathog* **46**:135-143.
214. **Ye C, Zheng H, Zhang J, Jing H, Wang L, et al.** 2009. Clinical, experimental, and genomic differences between intermediately pathogenic, highly pathogenic, and epidemic *Streptococcus suis*. *J Infect Dis* **199**:97-107.
215. **Graveline R, Segura M, Radzioch D, Gottschalk M.** 2007. TLR2-dependent recognition of *Streptococcus suis* is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness. *Int Immunol* **19**:375-389.
216. **Segura M, Vanier G, Al-Numani D, Lacouture S, Olivier M, et al.** 2006. Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a whole-blood culture system. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**:92-106.

217. **Tanabe S, Bonifait L, Fittipaldi N, Grignon L, Gottschalk M, et al.** 2010. Pleiotropic effects of polysaccharide capsule loss on selected biological properties of *Streptococcus suis*. *Can J Vet Res* **74**:65-70.
218. **Dang Y, Lachance C, Wang Y, Gagnon CA, Savard C, et al.** 2014. Transcriptional approach to study porcine tracheal epithelial cells individually or dually infected with swine influenza virus and *Streptococcus suis*. *BMC Vet Res* **10**:86.
219. **Wang Y, Gagnon CA, Savard C, Music N, Srednik M, et al.** 2013. Capsular sialic acid of *Streptococcus suis* serotype 2 binds to swine influenza virus and enhances bacterial interactions with virus-infected tracheal epithelial cells. *Infect Immun* **81**:4498-4508.
220. **Charland N, Nizet V, Rubens CE, Kim KS, Lacouture S, et al.** 2000. *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **68**:637-643.
221. **Bonifait L, Gottschalk M, Grenier D.** 2010. Cell surface characteristics of nontypeable isolates of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett* **311**:160-166.
222. **Kim KS.** 2006. Microbial translocation of the blood-brain barrier. *Int J Parasitol* **36**:607-614.
223. **Benga L, Friedl P, Valentin-Weigand P.** 2005. Adherence of *Streptococcus suis* to porcine endothelial cells. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **52**:392-395.
224. **Vanier G, Segura M, Gottschalk M.** 2007. Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Can J Vet Res* **71**:81-89.
225. **Al-Numani D, Segura M, Dore M, Gottschalk M.** 2003. Up-regulation of ICAM-1, CD11a/CD18 and CD11c/CD18 on human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *Clin Exp Immunol* **133**:67-77.
226. **Tenenbaum T, Papandreou T, Gellrich D, Friedrichs U, Seibt A, et al.** 2009. Polar bacterial invasion and translocation of *Streptococcus suis* across the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro. *Cell Microbiol* **11**:323-336.
227. **Tenenbaum T, Essmann F, Adam R, Seibt A, Janicke RU, et al.** 2006. Cell death, caspase activation, and HMGB1 release of porcine choroid plexus epithelial cells during *Streptococcus suis* infection in vitro. *Brain Res* **1100**:1-12.
228. **Jobin MC, Fortin J, Willson PJ, Gottschalk M, Grenier D.** 2005. Acquisition of plasmin activity and induction of arachidonic acid release by *Streptococcus suis* in contact with human brain microvascular endothelial cells. *FEMS Microbiol Lett* **252**:105-111.
229. **Grenier D, Bodet C.** 2008. *Streptococcus suis* stimulates ICAM-1 shedding from microvascular endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **54**:271-276.
230. **Zheng H, Punaro MC, Segura M, Lachance C, Rivest S, et al.** 2011. Toll-like receptor 2 is partially involved in the activation of murine astrocytes by *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent of meningitis. *J Neuroimmunol* **234**:71-83.
231. **Dominguez-Punaro Mde L, Segura M, Contreras I, Lachance C, Houde M, et al.** 2010. In vitro characterization of the microglial inflammatory response to *Streptococcus suis*, an important emerging zoonotic agent of meningitis. *Infect Immun* **78**:5074-5085.
232. **Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783-801.
233. **Kawai T, Akira S.** 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**:816-825.
234. **Mogensen TH.** 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* **22**:240-273.
235. **Janeway CA, Jr., Medzhitov R.** 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**:197-216.

236. **Baxt LA, Garza-Mayers AC, Goldberg MB.** 2013. Bacterial subversion of host innate immune pathways. *Science* **340**:697-701.
237. **Zipfel PF, Hallstrom T, Riesbeck K.** 2013. Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes--tipping the balance. *Mol Immunol* **56**:152-160.
238. **Zipfel PF, Skerka C.** 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* **9**:729-740.
239. **Zipfel PF, Wurzner R, Skerka C.** 2007. Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Mol Immunol* **44**:3850-3857.
240. **Conner SD, Schmid SL.** 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**:37-44.
241. **Lin AE, Guttman JA.** 2010. Hijacking the endocytic machinery by microbial pathogens. *Protoplasma* **244**:75-90.
242. **El-Sayed A, Harashima H.** 2013. Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol Ther* **21**:1118-1130.
243. **Lopez S, Arias CF.** 2010. How viruses hijack endocytic machinery. *Nature Education* **3**:16.
244. **Gold ES, Underhill DM, Morrisette NS, Guo J, McNiven MA, et al.** 1999. Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J Exp Med* **190**:1849-1856.
245. **Di A, Nelson DJ, Bindokas V, Brown ME, Libunao F, et al.** 2003. Dynamin regulates focal exocytosis in phagocytosing macrophages. *Mol Biol Cell* **14**:2016-2028.
246. **Bonazzi M, Cossart P.** 2006. Bacterial entry into cells: a role for the endocytic machinery. *FEBS Lett* **580**:2962-2967.
247. **Flannagan RS, Jaumouille V, Grinstein S.** 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* **7**:61-98.
248. **Underhill DM, Goodridge HS.** 2012. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol* **12**:492-502.
249. **Doherty GJ, McMahon HT.** 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* **78**:857-902.
250. **Praefcke GJ, McMahon HT.** 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:133-147.
251. **Jackson T.** 2014. Outline of the main events in receptor-mediated endocytosis, Abcam website, <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=10236#affil>.
252. **Parton RG, Simons K.** 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:185-194.
253. **Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, et al.** 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* **19**:7289-72304.
254. **Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, et al.** 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* **293**:2449-2452.
255. **Echarri A, Del Pozo MA.** 2006. Caveolae internalization regulates integrin-dependent signaling pathways. *Cell Cycle* **5**:2179-2182.
256. **Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA.** 1998. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* **141**:85-99.
257. **Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A.** 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* **3**:473-483.

258. **Hayer A, Stoeber M, Ritz D, Engel S, Meyer HH, et al.** 2010. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J Cell Biol* **191**:615-629.
259. **Singer SJ, Nicolson GL.** 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**:720-731.
260. **Simons K, Ikonen E.** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**:569-572.
261. **Lingwood D, Kaiser HJ, Levental I, Simons K.** 2009. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem Soc Trans* **37**:955-960.
262. **Bonazzi M, Veiga E, Pizarro-Cerda J, Cossart P.** 2008. Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for InlA-mediated internalization of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* **10**:2208-2222.
263. **Veiga E, Cossart P.** 2005. *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat Cell Biol* **7**:894-900.
264. **Veiga E, Guttman JA, Bonazzi M, Boucrot E, Toledo-Arana A, et al.** 2007. Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection. *Cell Host Microbe* **2**:340-351.
265. **Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK, Smeltzer MS, Kellam JF, et al.** 1999. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb Pathog* **26**:317-323.
266. **Gradstedt H, Iovino F, Bijlsma JJ.** 2013. *Streptococcus pneumoniae* invades endothelial host cells via multiple pathways and is killed in a lysosome dependent manner. *PLoS ONE* **8**:e65626.
267. **Rohde M, Muller E, Chhatwal GS, Talay SR.** 2003. Host cell caveolae act as an entry-port for group A streptococci. *Cell Microbiol* **5**:323-342.
268. **Almeida RA, Dunlap JR, Oliver SP.** 2010. Binding of Host Factors Influences Internalization and Intracellular Trafficking of *Streptococcus uberis* in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Vet Med Int* **2010**:319192.
269. **Gratz N, Hartweger H, Matt U, Kratochvill F, Janos M, et al.** 2011. Type I interferon production induced by *Streptococcus pyogenes*-derived nucleic acids is required for host protection. *PLoS Pathog* **7**:e1001345.
270. **Hybiske K, Stephens RS.** 2007. Mechanisms of *Chlamydia trachomatis* entry into nonphagocytic cells. *Infect Immun* **75**:3925-3934.
271. **Harvey HA, Jennings MP, Campbell CA, Williams R, Apicella MA.** 2001. Receptor-mediated endocytosis of *Neisseria gonorrhoeae* into primary human urethral epithelial cells: the role of the asialoglycoprotein receptor. *Mol Microbiol* **42**:659-672.
272. **Baorto DM, Gao Z, Malaviya R, Dustin ML, van der Merwe A, et al.** 1997. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature* **389**:636-639.
273. **Duncan L, Yoshioka M, Chandad F, Grenier D.** 2004. Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Microb Pathog* **36**:319-325.
274. **Eto DS, Gordon HB, Dhakal BK, Jones TA, Mulvey MA.** 2008. Clathrin, AP-2, and the NPXY-binding subset of alternate endocytic adaptors facilitate FimH-mediated bacterial invasion of host cells. *Cell Microbiol* **10**:2553-2567.
275. **Goosney DL, DeVinney R, Finlay BB.** 2001. Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. *Infect Immun* **69**:3315-3322.
276. **Byrne CM, Clyne M, Bourke B.** 2007. *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells in vitro. *Microbiology* **153**:561-569.

277. **Watson RO, Galan JE.** 2008. *Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. *PLoS Pathog* **4**:e14.
278. **Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, et al.** 2001. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* **276**:38121-38138.
279. **Bajmoczy M, Gadjeva M, Alper SL, Pier GB, Golan DE.** 2009. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and caveolin-1 regulate epithelial cell internalization of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**:263-277.
280. **Zaas DW, Swan ZD, Brown BJ, Li G, Randell SH, et al.** 2009. Counteracting signaling activities in lipid rafts associated with the invasion of lung epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **284**:9955-9964.
281. **Li S, Galbiati F, Volonte D, Sargiacomo M, Engelman JA, et al.** 1998. Mutational analysis of caveolin-induced vesicle formation. Expression of caveolin-1 recruits caveolin-2 to caveolae membranes. *FEBS Lett* **434**:127-134.
282. **Gibson RL, Lee MK, Soderland C, Chi EY, Rubens CE.** 1993. Group B streptococci invade endothelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion. *Infect Immun* **61**:478-485.
283. **Baron MJ, Bolduc GR, Goldberg MB, Auperin TC, Madoff LC.** 2004. Alpha C protein of group B *Streptococcus* binds host cell surface glycosaminoglycan and enters cells by an actin-dependent mechanism. *J Biol Chem* **279**:24714-24723.
284. **Santos GS, Loureiro y Penha CV, Mattos-Guaraldi AL, Attias M, Lopes-Bezerra LM, et al.** 2009. Group B *Streptococcus* induces tyrosine phosphorylation of annexin V and glutathione S-transferase in human umbilical vein endothelial cells. *Int J Mol Med* **24**:393-399.
285. **Burnham CA, Shokoples SE, Tyrrell GJ.** 2007. Rac1, RhoA, and Cdc42 participate in HeLa cell invasion by Group B *Streptococcus*. *FEMS Microbiol Lett* **272**:8-14.
286. **Wang QQ, Li H, Oliver T, Glogauer M, Guo J, et al.** 2008. Integrin beta 1 regulates phagosome maturation in macrophages through Rac expression. *J Immunol* **180**:2419-2428.
287. **Burnham CA, Shokoples SE, Tyrrell GJ.** 2007. Invasion of HeLa cells by Group B *Streptococcus* requires the phosphoinositide-3-kinase signalling pathway and modulates phosphorylation of host-cell Akt and glycogen synthase kinase-3. *Microbiology* **153**:4240-4252.
288. **Goluszko P, Popov V, Wen J, Jones A, Yallampalli C.** 2008. Group B streptococcus exploits lipid rafts and phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway to invade human endometrial cells. *Am J Obstet Gynecol* **199**:548 e541-549.
289. **Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I.** 2003. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* **21** 12-23.
290. **Vance RE, Isberg RR, Portnoy DA.** 2009. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe* **6**:10-21.
291. **Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT.** 2012. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* **249**:158-175.
292. **Nakamoto N, Kanai T.** 2014. Role of toll-like receptors in immune activation and tolerance in the liver. *Front Immunol* **5**:221.
293. **Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT.** 2009. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin Immunol* **21**:242-253.
294. **Leulier F, Lemaitre B.** 2008. Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet* **9**:165-178.

295. **Takeda K, Akira S.** 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**:1-14.
296. **Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A, Vitale M, et al.** 2014. TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When? *Front Immunol* **5**:105.
297. **Kawai T, Akira S.** 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**:373-384.
298. **van Bergenhenegouwen J, Plantinga TS, Joosten LA, Netea MG, Folkerts G, et al.** 2013. TLR2 & Co: a critical analysis of the complex interactions between TLR2 and coreceptors. *J Leukoc Biol* **94**:885-902.
299. **Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, Blanot D, Nahori MA, et al.** 2004. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* **5**:1000-1006.
300. **Hashimoto M, Tawaratsumida K, Kariya H, Aoyama K, Tamura T, et al.** 2006. Lipoprotein is a predominant Toll-like receptor 2 ligand in *Staphylococcus aureus* cell wall components. *Int Immunol* **18**:355-362.
301. **Zahringer U, Lindner B, Inamura S, Heine H, Alexander C.** 2008. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology* **213**:205-224.
302. **Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, et al.** 2007. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* **130**:1071-1082.
303. **Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, et al.** 2009. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* **31**:873-884.
304. **Dziarski R, Wang Q, Miyake K, Kirschning CJ, Gupta D.** 2001. MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated responses to lipopolysaccharide and enhances TLR2-mediated responses to Gram-positive and Gram-negative bacteria and their cell wall components. *J Immunol* **166**:1938-1944.
305. **Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesmuller KH, Jung G, Brock R, et al.** 2006. TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *J Biol Chem* **281**:9049-9057.
306. **Goodridge HS, Underhill DM.** 2008. Fungal Recognition by TLR2 and Dectin-1. *Handb Exp Pharmacol*:87-109.
307. **Manukyan M, Triantafilou K, Triantafilou M, Mackie A, Nilsen N, et al.** 2005. Binding of lipopeptide to CD14 induces physical proximity of CD14, TLR2 and TLR1. *Eur J Immunol* **35**:911-921.
308. **Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, et al.** 2005. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* **433**:523-527.
309. **Fournier B.** 2012. The function of TLR2 during staphylococcal diseases. *Front Cell Infect Microbiol* **2**:167.
310. **Triantafilou M, Lepper PM, Olden R, Dias IS, Triantafilou K.** 2011. Location, location, location: is membrane partitioning everything when it comes to innate immune activation? *Mediators Inflamm* **2011**:186093.
311. **Triantafilou M, Manukyan M, Mackie A, Morath S, Hartung T, et al.** 2004. Lipoteichoic acid and toll-like receptor 2 internalization and targeting to the Golgi are lipid raft-dependent. *J Biol Chem* **279**:40882-40889.
312. **Triantafilou M, Gamper FG, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, et al.** 2006. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem* **281**:31002-31011.

313. **Song DH, Lee JO.** 2012. Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors. *Immunol Rev* **250**:216-229.
314. **Publishing TC** 2014, posting date. Introduction to the Immune System (The Immune System in Health and Disease) (Rheumatology) Part 2. The Crankshaft Publishing. [Online.]
315. **Piras V, Selvarajoo K.** 2014. Beyond MyD88 and TRIF Pathways in Toll-Like Receptor Signaling. *Front Immunol* **5**:70.
316. **Ferrand J, Ferrero RL.** 2013. Recognition of Extracellular Bacteria by NLRs and Its Role in the Development of Adaptive Immunity. *Front Immunol* **4**:344-356.
317. **Kufer TA, Sansonetti PJ.** 2011. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat Immunol* **12**:121-128.
318. **Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, et al.** 2008. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* **28**:285-287.
319. **Kumar S, Ingle H, Prasad DV, Kumar H.** 2013. Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Crit Rev Microbiol* **39**:229-246.
320. **Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE.** 2006. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* **7**:1250-1257.
321. **Geddes K, Magalhaes JG, Girardin SE.** 2009. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. *Nat Rev Drug Discov* **8**:465-479.
322. **Carneiro LA, Travassos LH.** 2013. The Interplay between NLRs and Autophagy in Immunity and Inflammation. *Front Immunol* **4**:361-375.
323. **Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE.** 2014. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol* **14**:9-23.
324. **Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, et al.** 2004. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* **53**:1658-1664.
325. **Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, et al.** 2008. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* **57**:903-910.
326. **van Vliet SJ, Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y.** 2008. Dendritic cells and C-type lectin receptors: coupling innate to adaptive immune responses. *Immunol Cell Biol* **86**:580-587.
327. **Albanyan EA, Edwards MS.** 2000. Lectin site interaction with capsular polysaccharide mediates nonimmune phagocytosis of type III group B streptococci. *Infect Immun* **68**:5794-5802.
328. **Rooijackers SH, van Strijp JA.** 2007. Bacterial complement evasion. *Mol Immunol* **44**:23-32.
329. **Varki A, Crocker PR.** 2009. I-type Lectins. *In* Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME (ed.), *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed, Cold Spring Harbor (NY).
330. **Hartnell A, Steel J, Turley H, Jones M, Jackson DG, et al.** 2001. Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations. *Blood* **97**:288-296.
331. **Crocker PR.** 2005. Siglecs in innate immunity. *Curr Opin Pharmacol* **5**:431-437.
332. **Carlin AF, Lewis AL, Varki A, Nizet V.** 2007. Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. *J Bacteriol* **189**:1231-1237.
333. **Henneke P, Takeuchi O, van Strijp JA, Guttormsen HK, Smith JA, et al.** 2001. Novel engagement of CD14 and multiple toll-like receptors by group B streptococci. *J Immunol* **167**:7069-7076.

334. **Henneke P, Morath S, Uematsu S, Weichert S, Pfitzenmaier M, et al.** 2005. Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to Group B *Streptococcus*. *J Immunol* **174**:6449-6455.
335. **Draper DW, Bethea HN, He YW.** 2006. Toll-like receptor 2-dependent and -independent activation of macrophages by group B streptococci. *Immunol Lett* **102**:202-214.
336. **Bebien M, Hensler ME, Davanture S, Hsu LC, Karin M, et al.** 2012. The pore-forming toxin beta hemolysin/cytolysin triggers p38 MAPK-dependent IL-10 production in macrophages and inhibits innate immunity. *PLoS Pathog* **8**:e1002812.
337. **Flo TH, Halaas O, Lien E, Ryan L, Teti G, et al.** 2000. Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by Group B streptococci or lipopolysaccharide. *J Immunol* **164**:2064-2069.
338. **Henneke P, Takeuchi O, Malley R, Lien E, Ingalls RR, et al.** 2002. Cellular activation, phagocytosis, and bactericidal activity against group B streptococcus involve parallel myeloid differentiation factor 88-dependent and independent signaling pathways. *J Immunol* **169**:3970-3977.
339. **Puliti M, Uematsu S, Akira S, Bistoni F, Tissi L.** 2009. Toll-like receptor 2 deficiency is associated with enhanced severity of Group B streptococcal disease. *Infect Immun* **77**:1524-1531.
340. **Andrade EB, Alves J, Madureira P, Oliveira L, Ribeiro A, et al.** 2013. TLR2-induced IL-10 production impairs neutrophil recruitment to infected tissues during neonatal bacterial sepsis. *J Immunol* **191**:4759-4768.
341. **Mancuso G, Midiri A, Beninati C, Piraino G, Valenti A, et al.** 2002. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappa B are involved in TNF-alpha responses to Group B streptococci. *J Immunol* **169**:1401-1409.
342. **Doran KS, Liu GY, Nizet V.** 2003. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. *J Clin Invest* **112**:736-744.
343. **Vallejo JG, Baker CJ, Edwards MS.** 1996. Roles of the bacterial cell wall and capsule in induction of tumor necrosis factor alpha by type III group B streptococci. *Infect Immun* **64**:5042-5046.
344. **Cuzzola M, Mancuso G, Beninati C, Biondo C, von Hunolstein C, et al.** 2000. Human monocyte receptors involved in tumor necrosis factor responses to group B streptococcal products. *Infect Immun* **68**:994-998.
345. **Mancuso G, Tomasello F, von Hunolstein C, Orefici G, Teti G.** 1994. Induction of tumor necrosis factor alpha by the group- and type-specific polysaccharides from type III group B streptococci. *Infect Immun* **62**:2748-2753.
346. **Caliot E, Dramsi S, Chapot-Chartier MP, Courtin P, Kulakauskas S, et al.** 2012. Role of the Group B antigen of *Streptococcus agalactiae*: a peptidoglycan-anchored polysaccharide involved in cell wall biogenesis. *PLoS Pathog* **8**:e1002756.
347. **Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, et al.** 2003. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**:1584-1587.
348. **Charrel-Dennis M, Latz E, Halmen KA, Trieu-Cuot P, Fitzgerald KA, et al.** 2008. TLR-independent type I interferon induction in response to an extracellular bacterial pathogen via intracellular recognition of its DNA. *Cell Host Microbe* **4**:543-554.
349. **Goodrum KJ, Dierksheide J, Yoder BJ.** 1995. Tumor necrosis factor alpha acts as an autocrine second signal with gamma interferon to induce nitric oxide in group B streptococcus-treated macrophages. *Infect Immun* **63**:3715-3717.

350. **Chang YC, Olson J, Beasley FC, Tung C, Zhang J, et al.** 2014. Group B *Streptococcus* engages an inhibitory Siglec through sialic acid mimicry to blunt innate immune and inflammatory responses in vivo. *PLoS Pathog* **10**:e1003846.
351. **Carlin AF, Chang YC, Areschoug T, Lindahl G, Hurtado-Ziola N, et al.** 2009. Group B *Streptococcus* suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5. *J Exp Med* **206**:1691-1699.
352. **Nordstrom T, Moverf E, Olin AI, Ali SR, Nizet V, et al.** 2011. Human Siglec-5 inhibitory receptor and immunoglobulin A (IgA) have separate binding sites in streptococcal beta protein. *J Biol Chem* **286**:33981-33991.
353. **Ali SR, Fong JJ, Carlin AF, Busch TD, Linden R, et al.** 2014. Siglec-5 and Siglec-14 are polymorphic paired receptors that modulate neutrophil and amnion signaling responses to Group B *Streptococcus*. *J Exp Med* **211**:1231-1242.
354. **Chang YC, Olson J, Louie A, Crocker PR, Varki A, et al.** 2014. Role of macrophage sialoadhesin in host defense against the sialylated pathogen Group B *Streptococcus*. *J Mol Med (Berl)* *In Press*.
355. **Zheng H, Luo X, Segura M, Sun H, Ye C, et al.** 2012. The role of toll-like receptors in the pathogenesis of *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* **156**:147-156.
356. **Wichgers Schreur PJ, Rebel JM, Smits MA, van Putten JP, Smith HE.** 2011. Lgt processing is an essential step in *Streptococcus suis* lipoprotein mediated innate immune activation. *PLoS ONE* **6**:e22299.
357. **Lachance C, Segura M, Gerber PP, Xu J, Gottschalk M.** 2013. Toll-like receptor 2-independent host innate immune response against an epidemic strain of *Streptococcus suis* that causes a toxic shock-like syndrome in humans. *PLoS ONE* **8**:e65031.
358. **Lipscomb MF, Masten BJ.** 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* **82**:97-130.
359. **Tam MA, Rydstrom A, Sundquist M, Wick MJ.** 2008. Early cellular responses to *Salmonella* infection: dendritic cells, monocytes, and more. *Immunol Rev* **225**:140-162.
360. **Sathe P, Shortman K.** 2008. The steady-state development of splenic dendritic cells. *Mucosal Immunol* **1**:425-431.
361. **Ardavin C.** 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol* **3**:582-590.
362. **Shortman K, Liu YJ.** 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2**:151-161.
363. **Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, et al.** 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**:767-811.
364. **Bergtold A, Desai DD, Gavhane A, Clynes R.** 2005. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* **23**:503-514.
365. **Naik SH.** 2008. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol Cell Biol* **86**:439-452.
366. **Merad M, Manz MG.** 2009. Dendritic cell homeostasis. *Blood* **113**:3418-3427.
367. **Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, et al.** 2000. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* **290**:2152-2154.
368. **Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K.** 2001. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* **97**:3333-3341.
369. **Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A.** 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* **31**:563-604.

370. **D'Amico A, Wu L.** 2003. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med* **198**:293-303.
371. **Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL, Manz MG.** 2003. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med* **198**:305-313.
372. **Mende I, Karsunky H, Weissman IL, Engleman EG, Merad M.** 2006. Flk2+ myeloid progenitors are the main source of Langerhans cells. *Blood* **107**:1383-1390.
373. **Shurin MR, Pandharipande PP, Zorina TD, Haluszczak C, Subbotin VM, et al.** 1997. FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice. *Cell Immunol* **179**:174-184.
374. **Banchereau J, Palucka AK.** 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* **5**:296-306.
375. **Zhan Y, Carrington EM, van Nieuwenhuijze A, Bedoui S, Seah S, et al.** 2011. GM-CSF increases cross-presentation and CD103 expression by mouse CD8(+) spleen dendritic cells. *Eur J Immunol* **41**:2585-2595.
376. **Belz GT, Nutt SL.** 2012. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* **12**:101-113.
377. **Wu L, D'Amico A, Hochrein H, O'Keeffe M, Shortman K, et al.** 2001. Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* **98**:3376-3382.
378. **del Hoyo GM, Martin P, Vargas HH, Ruiz S, Arias CF, et al.** 2002. Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* **415**:1043-1047.
379. **Pulendran B, Banchereau J, Maraskovsky E, Maliszewski C.** 2001. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol* **22**:41-47.
380. **Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG.** 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* **19**:59-70.
381. **Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, Bahrn U, Kouro T, et al.** 2006. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* **24**:801-812.
382. **Martin P, del Hoyo GM, Anjuere F, Ruiz SR, Arias CF, et al.** 2000. Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors. *Blood* **96**:2511-2519.
383. **Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, Omatsu Y, Akiyama Y, et al.** 2002. The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* **195**:1289-1302.
384. **Anjuere F, Martin P, Ferrero I, Fraga ML, del Hoyo GM, et al.** 1999. Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* **93**:590-598.
385. **Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, et al.** 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* **2**:1144-1150.
386. **Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, et al.** 2006. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev* **214**:219-228.

387. **Bilsborough J, George TC, Norment A, Viney JL.** 2003. Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* **108**:481-492.
388. **Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, et al.** 2010. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol* **11**:585-593.
389. **Poulin LF, Salio M, Griessinger E, Anjos-Afonso F, Craciun L, et al.** 2010. Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med* **207**:1261-1271.
390. **Shortman K, Naik SH.** 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* **7**:19-30.
391. **Collin M, McGovern N, Haniffa M.** 2013. Human dendritic cell subsets. *Immunology* **140**:22-30.
392. **Wilson NS, El-Sukkari D, Villadangos JA.** 2004. Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state *in vivo* and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood* **103**:2187-2195.
393. **Chung CY, Ysebaert D, Berneman ZN, Cools N.** 2013. Dendritic cells: cellular mediators for immunological tolerance. *Clin Dev Immunol* **2013**:972865.
394. **Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H.** 2002. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **80**:477-483.
395. **Castellino F, Zhong G, Germain RN.** 1997. Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum Immunol* **54**:159-169.
396. **Rovere P, Zimmermann VS, Forquet F, Demandolx D, Trucy J, et al.** 1998. Dendritic cell maturation and antigen presentation in the absence of invariant chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:1067-1072.
397. **Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A.** 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**:782-787.
398. **Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, et al.** 1997. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* **186**:665-672.
399. **Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, et al.** 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* **185**:317-328.
400. **Mosialos G, Birkenbach M, Ayehunie S, Matsumura F, Pinkus GS, et al.** 1996. Circulating human dendritic cells differentially express high levels of a 55-kd actin-bundling protein. *Am J Pathol* **148**:593-600.
401. **Kolb-Maurer A, Kurzai O, Goebel W, Frosch M.** 2003. The role of human dendritic cells in meningococcal and listerial meningitis. *Int J Med Microbiol* **293**:241-249.
402. **Kuri T, Sorensen AS, Thomas S, Karlsson Hedestam GB, Normark S, et al.** 2013. Influenza A virus-mediated priming enhances cytokine secretion by human dendritic cells infected with *Streptococcus pneumoniae*. *Cell Microbiol* **15**:1385-1400.
403. **Cao J, Gong Y, Dong S, Zhang L, Lai X, et al.** 2013. Pneumococcal ClpP modulates the maturation and activation of human dendritic cells: implications for pneumococcal infections. *J Leukoc Biol* **93**:737-749.
404. **Ganem MB, De Marzi MC, Fernandez-Lynch MJ, Jancic C, Vermeulen M, et al.** 2013. Uptake and intracellular trafficking of superantigens in dendritic cells. *PLoS ONE* **8**:e66244.

405. **Li H, Wang D.** 2014. *Streptococcus mutans* Wall-Associated Protein A Promotes TLR4-Induced Dendritic Cell Maturation. *Scand J Immunol* **80**:121-126.
406. **Butcher JP, Malcolm J, Benson RA, Deng DM, Brewer JM, et al.** 2011. Effects of *Streptococcus mutans* on dendritic cell activation and function. *J Dent Res* **90**:1221-1227.
407. **Kolb-Maurer A, Kammerer U, Maurer M, Gentschev I, Brocker EB, et al.** 2003. Production of IL-12 and IL-18 in human dendritic cells upon infection by *Listeria monocytogenes*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**:255-262.
408. **Cornacchione P, Scaringi L, Fettucciari K, Rosati E, Sabatini R, et al.** 1998. Group B streptococci persist inside macrophages. *Immunology* **93**:86-95.
409. **Ulett GC, Maclean KH, Nekkalapu S, Cleveland JL, Adderson EE.** 2005. Mechanisms of Group B streptococcal-induced apoptosis of murine macrophages. *J Immunol* **175**:2555-2562.
410. **Thorntwaite J.** 2014. The Immune System and The Natural Killer Cells, Cancer Foundation of West Tennessee, <http://www.cancerfoundation.com/NKcells.html>.
411. **Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, et al.** 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* **331**:44-49.
412. **Cichocki F, Sitnicka E, Bryceson YT.** 2014. NK cell development and function--plasticity and redundancy unleashed. *Semin Immunol* **26**:114-126.
413. **Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S.** 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* **9**:503-510.
414. **Yu J, Freud AG, Caligiuri MA.** 2013. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol* **34**:573-582.
415. **Chiang SC, Theorell J, Entesarian M, Meeths M, Mastafa M, et al.** 2013. Comparison of primary human cytotoxic T-cell and natural killer cell responses reveal similar molecular requirements for lytic granule exocytosis but differences in cytokine production. *Blood* **121**:1345-1356.
416. **Sun JC, Lopez-Verges S, Kim CC, DeRisi JL, Lanier LL.** 2011. NK cells and immune "memory". *J Immunol* **186**:1891-1897.
417. **Yokoyama WM, Kim S, French AR.** 2004. The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol* **22**:405-429.
418. **Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP.** 2003. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* **3**:413-425.
419. **Di Santo JP.** 2006. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol* **24**:257-286.
420. **Kondo M, Weissman IL, Akashi K.** 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**:661-672.
421. **Fathman JW, Bhattacharya D, Inlay MA, Seita J, Karsunky H, et al.** 2011. Identification of the earliest natural killer cell-committed progenitor in murine bone marrow. *Blood* **118**:5439-5447.
422. **Waldmann TA, Tagaya Y.** 1999. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol* **17**:19-49.
423. **Vosshenrich CA, Di Santo JP.** 2013. Developmental programming of natural killer and innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol* **25**:130-138.
424. **Hayakawa Y, Smyth MJ.** 2006. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol* **176**:1517-1524.
425. **Freud AG, Becknell B, Roychowdhury S, Mao HC, Ferketich AK, et al.** 2005. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* **22**:295-304.

426. **Chan A, Hong DL, Atzberger A, Kollnberger S, Filer AD, et al.** 2007. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* **179**:89-94.
427. **Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D'Agostino A, et al.** 2007. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* **178**:4947-4955.
428. **Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, et al.** 2010. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* **116**:3853-3864.
429. **Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, Ross ME, Wang WC, et al.** 1998. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol* **161**:400-408.
430. **Ranson T, Vosschenrich CA, Corcuff E, Richard O, Muller W, et al.** 2003. IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood* **101**:4887-4893.
431. **Koka R, Burkett PR, Chien M, Chai S, Chan F, et al.** 2003. Interleukin (IL)-15R[alpha]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R[alpha]-deficient mice. *J Exp Med* **197**:977-984.
432. **Prlic M, Blazar BR, Farrar MA, Jameson SC.** 2003. *In vivo* survival and homeostatic proliferation of natural killer cells. *J Exp Med* **197**:967-976.
433. **Kim S, Iizuka K, Kang HS, Dokun A, French AR, et al.** 2002. *In vivo* developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol* **3**:523-528.
434. **De Colvenaer V, Taveirne S, Delforche M, De Smedt M, Vandekerckhove B, et al.** 2011. CD27-deficient mice show normal NK-cell differentiation but impaired function upon stimulation. *Immunol Cell Biol* **89**:803-811.
435. **Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, Roth C, Vivier E, et al.** 2009. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* **113**:5488-5496.
436. **Caligiuri MA.** 2008. Human natural killer cells. *Blood* **112**:461-469.
437. **Montaldo E, Vacca P, Moretta L, Mingari MC.** 2014. Development of human natural killer cells and other innate lymphoid cells. *Semin Immunol* **26**:107-113.
438. **Fu B, Tian Z, Wei H.** 2014. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology* **141**:483-489.
439. **Inngjerdigen M, Kveberg L, Naper C, Vaage JT.** 2011. Natural killer cell subsets in man and rodents. *Tissue Antigens* **78**:81-88.
440. **Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, et al.** 1996. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol* **14**:619-648.
441. **Trapani JA, Smyth MJ.** 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* **2**:735-747.
442. **Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon JJ, van den Brink MR, et al.** 2003. Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* **18**:1-6.
443. **Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H.** 2002. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* **2**:850-861.
444. **Moretta A.** 2002. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol* **2**:957-964.
445. **Carrega P, Ferlazzo G.** 2012. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Front Immunol* **3**:347.
446. **Souza-Fonseca-Guimaraes F, Adib-Conquy M, Cavaillon JM.** 2012. Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: angels or devils? *Mol Med* **18**:270-285.
447. **Lauzon NM, Mian F, MacKenzie R, Ashkar AA.** 2006. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cell Immunol* **241**:102-112.

448. **Comin F, Speziali E, Martins-Filho OA, Caldas IR, Moura V, et al.** 2007. Ageing and Toll-like receptor expression by innate immune cells in chronic human schistosomiasis. *Clin Exp Immunol* **149**:274-284.
449. **Adib-Conquy M, Scott-Algara D, Cavaillon JM, Souza-Fonseca-Guimaraes F.** 2014. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunol Cell Biol* **92**:256-262.
450. **Martinez J, Huang X, Yang Y.** 2010. Direct TLR2 signaling is critical for NK cell activation and function in response to vaccinia viral infection. *PLoS Pathog* **6**:e1000811.
451. **Qiu F, Maniar A, Diaz MQ, Chapoval AI, Medvedev AE.** 2011. Activation of cytokine-producing and antitumor activities of natural killer cells and macrophages by engagement of Toll-like and NOD-like receptors. *Innate Immun* **17**:375-387.
452. **Perrot I, Deauvieu F, Massacrier C, Hughes N, Garrone P, et al.** 2010. TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA. *J Immunol* **185**:2080-2088.
453. **Chalifour A, Jeannin P, Gauchat JF, Blaecke A, Malissard M, et al.** 2004. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* **104**:1778-1783.
454. **Millard AL, Spirig R, Mueller NJ, Seebach JD, Rieben R.** 2010. Inhibition of direct and indirect TLR-mediated activation of human NK cells by low molecular weight dextran sulfate. *Mol Immunol* **47**:2349-2358.
455. **Tsujimoto H, Uchida T, Efron PA, Scumpia PO, Verma A, et al.** 2005. Flagellin enhances NK cell proliferation and activation directly and through dendritic cell-NK cell interactions. *J Leukoc Biol* **78**:888-897.
456. **Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M.** 2012. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS ONE* **7**:e44746.
457. **Lopez MC, Duckett NS, Baron SD, Metzger DW.** 2004. Early activation of NK cells after lung infection with the intracellular bacterium, *Francisella tularensis* LVS. *Cell Immunol* **232**:75-85.
458. **Thale C, Kiderlen AF.** 2005. Sources of interferon-gamma in early immune response to *Listeria monocytogenes*. *Immunobiology* **210**:673-683.
459. **Kupz A, Curtiss R, 3rd, Bedoui S, Strugnell RA.** 2014. In vivo IFN-gamma secretion by NK cells in response to *Salmonella typhimurium* requires NLRC4 inflammasomes. *PLoS ONE* **9**:e97418.
460. **Feng CG, Kaviratne M, Rothfuchs AG, Cheever A, Hieny S, et al.** 2006. NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **177**:7086-7093.
461. **Mitchell AJ, Yau B, McQuillan JA, Ball HJ, Too LK, et al.** 2012. Inflammasome-dependent IFN-gamma drives pathogenesis in *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Immunol* **189**:4970-4880.
462. **McNeela EA, Burke A, Neill DR, Baxter C, Fernandes VE, et al.** 2010. Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog* **6**:e1001191.
463. **Goldmann O, Chhatwal GS, Medina E.** 2005. Contribution of natural killer cells to the pathogenesis of septic shock induced by *Streptococcus pyogenes* in mice. *J Infect Dis* **191**:1280-1286.

464. **Mancuso G, Midiri A, Biondo C, Beninati C, Zummo S, et al.** 2007. Type I IFN signaling is crucial for host resistance against different species of pathogenic bacteria. *J Immunol* **178**:3126-3133.
465. **Shah PD, Gilbertson SM, Rowley DA.** 1985. Dendritic cells that have interacted with antigen are targets for natural killer cells. *J Exp Med* **162**:625-636.
466. **Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, et al.** 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses *in vivo*. *Nat Med* **5**:405-411.
467. **Horowitz A, Stegmann KA, Riley EM.** 2011. Activation of natural killer cells during microbial infections. *Front Immunol* **2**:88.
468. **Moretta A, Marcenaro E, Sivori S, Della Chiesa M, Vitale M, et al.** 2005. Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. *Trends Immunol* **26**:668-675.
469. **Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA.** 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* **19**:641-644.
470. **Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, et al.** 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* **195**:327-333.
471. **Marcenaro E, Della Chiesa M, Bellora F, Parolini S, Millo R, et al.** 2005. IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *J Immunol* **174**:3992-3998.
472. **Agaugue S, Marcenaro E, Ferranti B, Moretta L, Moretta A.** 2008. Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **112**:1776-1783.
473. **Akira S.** 2000. The role of IL-18 in innate immunity. *Curr Opin Immunol* **12**:59-63.
474. **Trinchieri G.** 1998. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int Rev Immunol* **16**:365-396.
475. **Liu L, Wang S, Shan B, Shao L, Sato A, et al.** 2008. IL-27-mediated activation of natural killer cells and inflammation produced antitumour effects for human oesophageal carcinoma cells. *Scand J Immunol* **68**:22-29.
476. **Yu Y, Hagihara M, Ando K, Gansuud B, Matsuzawa H, et al.** 2001. Enhancement of human cord blood CD34+ cell-derived NK cell cytotoxicity by dendritic cells. *J Immunol* **166**:1590-1600.
477. **van de Wetering D, de Paus RA, van Dissel JT, van de Vosse E.** 2009. IL-23 modulates CD56+/CD3- NK cell and CD56+/CD3+ NK-like T cell function differentially from IL-12. *Int Immunol* **21**:145-153.
478. **Dalod M, Hamilton T, Salomon R, Salazar-Mather TP, Henry SC, et al.** 2003. Dendritic cell responses to early murine *cytomegalovirus* infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J Exp Med* **197**:885-898.
479. **Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, et al.** 2004. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16606-16611.
480. **Robertson MJ.** 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* **71**:173-183.
481. **Borg C, Jalil A, Laderach D, Maruyama K, Wakasugi H, et al.** 2004. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* **104**:3267-3275.
482. **Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, et al.** 2003. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic

- cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* **170**:1249-1256.
483. **Iizuka K, Naidenko OV, Plougastel BF, Fremont DH, Yokoyama WM.** 2003. Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKRP1 family of natural killer cell receptors. *Nat Immunol* **4**:801-807.
 484. **Ferlazzo G.** 2005. Natural killer and dendritic cell liaison: recent insights and open questions. *Immunol Lett* **101**:12-17.
 485. **Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Arico M, et al.** 2005. NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* **106**:566-571.
 486. **Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, et al.** 2004. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol* **173**:3716-3724.
 487. **Cusumano V, Mancuso G, Genovese F, Delfino D, Beninati C, et al.** 1996. Role of gamma interferon in a neonatal mouse model of Group B streptococcal disease. *Infect Immun* **64**:2941-2944.
 488. **Cusumano V, Midiri A, Cusumano VV, Bellantoni A, De Sossi G, et al.** 2004. Interleukin-18 is an essential element in host resistance to experimental Group B streptococcal disease in neonates. *Infect Immun* **72**:295-300.
 489. **Mancuso G, Cusumano V, Genovese F, Gambuzza M, Beninati C, et al.** 1997. Role of interleukin 12 in experimental neonatal sepsis caused by Group B streptococci. *Infect Immun* **65**:3731-3735.
 490. **Derrico CA, Goodrum KJ.** 1996. Interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha mediate innate production of gamma interferon by Group B *Streptococcus*-treated splenocytes of severe combined immunodeficiency mice. *Infect Immun* **64**:1314-1320.
 491. **Humann J, Lenz LL.** 2010. Activation of naive NK cells in response to *Listeria monocytogenes* requires IL-18 and contact with infected dendritic cells. *J Immunol* **184**:5172-5178.
 492. **Marcenaro E, Ferranti B, Falco M, Moretta L, Moretta A.** 2008. Human NK cells directly recognize *Mycobacterium bovis* via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC. *Int Immunol* **20**:1155-1167.
 493. **Poyart C, Pellegrini E, Marceau M, Baptista M, Jaubert F, et al.** 2003. Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol Microbiol* **49**:1615-1625.
 494. **Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, et al.** 2009. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* **10**:587-594.
 495. **Nagl M, Kacani L, Mullauer B, Lemberger EM, Stoiber H, et al.** 2002. Phagocytosis and killing of bacteria by professional phagocytes and dendritic cells. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**:1165-1168.
 496. **Netea MG, Gijzen K, Coolen N, Verschueren I, Figdor C, et al.** 2004. Human dendritic cells are less potent at killing *Candida albicans* than both monocytes and macrophages. *Microbes Infect* **6**:985-989.
 497. **Teixeira CF, Azevedo NL, Carvalho TM, Fuentes J, Nagao PE.** 2001. Cytochemical study of *Streptococcus agalactiae* and macrophage interaction. *Microsc Res Tech* **54**:254-259.
 498. **Da Costa AF, Pereira CS, Santos Gda S, Carvalho TM, Hirata R, Jr., et al.** 2011. Group B *Streptococcus* serotypes III and V induce apoptosis and necrosis of human epithelial A549 cells. *Int J Mol Med* **27**:739-744.

499. **Tyrrell GJ, Kennedy A, Shokoples SE, Sherburne RK.** 2002. Binding and invasion of HeLa and MRC-5 cells by *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology* **148**:3921-3931.
500. **Lecours MP, Segura M, Lachance C, Mussa T, Surprenant C, et al.** 2011. Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. *Vet Res* **42**:72.
501. **Meijerink M, Ferrando ML, Lammers G, Taverne N, Smith HE, et al.** 2012. Immunomodulatory effects of *Streptococcus suis* capsule type on human dendritic cell responses, phagocytosis and intracellular survival. *PLoS ONE* **7**:e35849.
502. **Pizarro-Cerda J, Bonazzi M, Cossart P.** 2010. Clathrin-mediated endocytosis: what works for small, also works for big. *Bioessays* **32**:496-504.
503. **Veiga E, Cossart P.** 2006. The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization. *Trends Cell Biol* **16**:499-504.
504. **Manes S, del Real G, Martinez AC.** 2003. Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol* **3**:557-568.
505. **Vieira FS, Correa G, Einicker-Lamas M, Coutinho-Silva R.** 2010. Host-cell lipid rafts: a safe door for micro-organisms? *Biol Cell* **102**:391-407.
506. **Duncan MJ, Shin JS, Abraham SN.** 2002. Microbial entry through caveolae: variations on a theme. *Cell Microbiol* **4**:783-791.
507. **Wang M, Hajishengallis G.** 2008. Lipid raft-dependent uptake, signalling and intracellular fate of *Porphyromonas gingivalis* in mouse macrophages. *Cell Microbiol* **10**:2029-2042.
508. **Seveau S, Bierre H, Giroux S, Prevost MC, Cossart P.** 2004. Role of lipid rafts in E-cadherin-- and HGF-R/Met--mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *J Cell Biol* **166**:743-753.
509. **Tateno H, Li H, Schur MJ, Bovin N, Crocker PR, et al.** 2007. Distinct endocytic mechanisms of CD22 (Siglec-2) and Siglec-F reflect roles in cell signaling and innate immunity. *Mol Cell Biol* **27**:5699-5710.
510. **Nakayama H, Yoshizaki F, Prinetti A, Sonnino S, Mauri L, et al.** 2008. Lyn-coupled LacCer-enriched lipid rafts are required for CD11b/CD18-mediated neutrophil phagocytosis of nonopsonized microorganisms. *J Leukoc Biol* **83**:728-741.
511. **Antal JM, Cunningham JV, Goodrum KJ.** 1992. Opsonin-independent phagocytosis of Group B streptococci: role of complement receptor type three. *Infect Immun* **60**:1114-1121.
512. **Gadjeva M, Paradis-Bleau C, Priebe GP, Fichorova R, Pier GB.** 2010. Caveolin-1 modifies the immunity to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol* **184**:296-302.
513. **Blander JM, Medzhitov R.** 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* **304**:1014-1018.
514. **Letiembre M, Echchannaoui H, Bachmann P, Ferracin F, Nieto C, et al.** 2005. Toll-like receptor 2 deficiency delays pneumococcal phagocytosis and impairs oxidative killing by granulocytes. *Infect Immun* **73**:8397-8401.
515. **Deshmukh HS, Hamburger JB, Ahn SH, McCafferty DG, Yang SR, et al.** 2009. Critical role of NOD2 in regulating the immune response to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **77**:1376-1382.
516. **Dharancy S, Body-Malapel M, Louvet A, Berrebi D, Gantier E, et al.** 2010. Neutrophil migration during liver injury is under nucleotide-binding oligomerization domain 1 control. *Gastroenterology* **138**:1546-1556, 1556 e1541-1545.
517. **von Delwig A, Bailey E, Gibbs DM, Robinson JH.** 2002. The route of bacterial uptake by macrophages influences the repertoire of epitopes presented to CD4 T cells. *Eur J Immunol* **32**:3714-3719.
518. **Costa A, Gupta R, Signorino G, Malara A, Cardile F, et al.** 2012. Activation of the NLRP3 inflammasome by Group B streptococci. *J Immunol* **188**:1953-1960.

519. **Kapadia D, Sadikovic A, Vanloubbeeck Y, Brockstedt D, Fong L.** 2011. Interplay between CD8alpha+ dendritic cells and monocytes in response to *Listeria monocytogenes* infection attenuates T cell responses. PLoS ONE **6**:e19376.
520. **Fettucciari K, Rosati E, Scaringi L, Cornacchione P, Migliorati G, et al.** 2000. Group B Streptococcus induces apoptosis in macrophages. J Immunol **165**:3923-3933.
521. **Ulett GC, Bohnsack JF, Armstrong J, Adderson EE.** 2003. Beta-hemolysin-independent induction of apoptosis of macrophages infected with serotype III Group B *Streptococcus*. J Infect Dis **188**:1049-1053.
522. **Warner N, Nunez G.** 2013. MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction. J Immunol **190**:3-4.
523. **Mancuso G, Midiri A, Beninati C, Biondo C, Galbo R, et al.** 2004. Dual role of TLR2 and MyD88 in a mouse model of invasive Group B streptococcal disease. J Immunol **172**:6324-6329.
524. **Opitz B, Puschel A, Schmeck B, Hocke AC, Rosseau S, et al.** 2004. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. J Biol Chem **279**:36426-36432.
525. **Liu X, Chauhan VS, Young AB, Marriott I.** 2010. NOD2 mediates inflammatory responses of primary murine glia to *Streptococcus pneumoniae*. Glia **58**:839-847.
526. **Kapetanovic R, Jouvion G, Fitting C, Parlato M, Blanchet C, et al.** 2010. Contribution of NOD2 to lung inflammation during *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. Microbes Infect **12**:759-767.
527. **Davis KM, Nakamura S, Weiser JN.** 2011. NOD2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. J Clin Invest **121**:3666-3676.
528. **Talati AJ, Kim HJ, Kim YI, Yi AK, English BK.** 2008. Role of bacterial DNA in macrophage activation by Group B streptococci. Microbes Infect **10**:1106-1113.
529. **Bandow K, Kusuyama J, Shamoto M, Kakimoto K, Ohnishi T, et al.** 2012. LPS-induced chemokine expression in both MyD88-dependent and -independent manners is regulated by Cot/Tpl2-ERK axis in macrophages. FEBS Lett **586**:1540-1546.
530. **Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Delano MJ, Weinstein JS, Cuenca AG, et al.** 2010. Type I interferon signaling in hematopoietic cells is required for survival in mouse polymicrobial sepsis by regulating CXCL10. J Exp Med **207**:319-326.
531. **Dominguez-Punaro Mde L, Segura M, Radzioch D, Rivest S, Gottschalk M.** 2008. Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. Infect Immun **76**:3901-3910.
532. **Thale C, Kiderlen AF.** 2005. Sources of IFN-gamma in early immune response to *Listeria monocytogenes*. Immunobiology **210**:673-683.
533. **Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, et al.** 2003. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. Mol Biochem Parasitol **130**:65-74.
534. **Nylen S, Maasho K, Soderstrom K, Ilg T, Akuffo H.** 2003. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. Clin Exp Immunol **131**:457-467.
535. **Esin S, Batoni G, Counoupas C, Stringaro A, Brancatisano FL, et al.** 2008. Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. Infect Immun **76**:1719-1727.
536. **Bouwer AL, Saunderson SC, Dunn AC, Lester KL, Crowley LR, et al.** 2013. Rapid interferon-gamma release from natural killer cells induced by a streptococcal commensal. J Interferon Cytokine Res **33**:459-466.

537. **Haller D, Serrant P, Granato D, Schiffrin EJ, Blum S.** 2002. Activation of human NK cells by staphylococci and lactobacilli requires cell contact-dependent costimulation by autologous monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**:649-657.
538. **Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Van Kaer L, Saiki I, et al.** 2001. Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *J Immunol* **166**:6012-6218.
539. **Scott MJ, Hoth JJ, Stagner MK, Gardner SA, Peyton JC, et al.** 2004. CD40-CD154 interactions between macrophages and natural killer cells during sepsis are critical for macrophage activation and are not interferon gamma dependent. *Clin Exp Immunol* **137**:469-477.
540. **Zanoni I, Spreafico R, Bodio C, Di Gioia M, Cigni C, et al.** 2013. IL-15 *cis* presentation is required for optimal NK cell activation in lipopolysaccharide-mediated inflammatory conditions. *Cell Rep* **4**:1235-1249.
541. **Trinchieri G.** 2010. Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* **207**:2053-2063.
542. **Gupta R, Ghosh S, Monks B, Deoliveira R, Tzeng T, et al.** 2014. RNA and beta-hemolysin of Group B *Streptococcus* induce IL-1beta by activating NLRP3 inflammasomes in mouse macrophages. *J Biol Chem* **289**:13701-13705.
543. **Tseng CT, Rank RG.** 1998. Role of NK cells in early host response to chlamydial genital infection. *Infect Immun* **66**:5867-5875.
544. **Unanue ER.** 1997. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol Rev* **158**:11-25.
545. **Scharton TM, Scott P.** 1993. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med* **178**:567-577.
546. **Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A.** 1993. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:6115-6119.
547. **Dowdell KC, Cua DJ, Kirkman E, Stohlman SA.** 2003. NK cells regulate CD4 responses prior to antigen encounter. *J Immunol* **171**:234-239.
548. **Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA.** 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* **24**:99-146.
549. **Salazar-Mather TP, Hamilton TA, Biron CA.** 2000. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *J Clin Invest* **105**:985-993.
550. **Dorner BG, Scheffold A, Rolph MS, Huser MB, Kaufmann SH, et al.** 2002. MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:6181-6186.
551. **Dorner BG, Smith HR, French AR, Kim S, Poursine-Laurent J, et al.** 2004. Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* **172**:3119-3131.
552. **Paust S, Senman B, von Andrian UH.** 2010. Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunol Rev* **235**:286-296.
553. **Groom JR, Luster AD.** 2011. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res* **317**:620-631.
554. **Kanswal S, Katsenelson N, Allman W, Uslu K, Blake MS, et al.** 2011. Suppressive effect of bacterial polysaccharides on BAFF system is responsible for their poor immunogenicity. *J Immunol* **186**:2430-2443.
555. **Lecours MP, Fittipaldi N, Takamatsu D, Okura M, Segura M, et al.** 2012. Sialylation of *Streptococcus suis* serotype 2 is essential for capsule expression but is not responsible for the main capsular epitope. *Microbes Infect* **14**:941-950.
556. **Houde M, Gottschalk M, Gagnon F, Van Calsteren MR, Segura M.** 2012. *Streptococcus suis* capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through

- destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition. *Infect Immun* **80**:506-517.
557. **Kolb-Maurer A, Unkmeir A, Kammerer U, Hubner C, Leimbach T, et al.** 2001. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Infect Immun* **69**:6912-6922.
558. **Maurer M, von Stebut E.** 2004. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* **36**:1882-1886.
559. **Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE.** 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* **29**:313-326.
560. **Okazaki K, Kondo M, Kato M, Nishida A, Takahashi H, et al.** 2008. Temporal alterations in concentrations of sera cytokines/chemokines in sepsis due to Group B *Streptococcus* infection in a neonate. *Jpn J Infect Dis* **61**:382-385.

ANNEXE I, ARTICLE VII

“Critical role for *Streptococcus* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells”

Marie-Pier Lecours, Marcelo Gottschalk, Mathieu Houde, Paul Lemire, Nahuel Fittipaldi and Mariela Segura.

Publié dans: *J Infect Dis.* 2011. 204(6):919-929.

DOI: 10.1016/j.micinf.2012.05.015.

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

J'ai participé partiellement aux expériences *in vitro* avec les DCs de l'article.

Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells

Marie-Pier Lecours¹, Marcelo Gottschalk¹, Mathieu Houde¹, Paul Lemire¹, Nahuel Fittipaldi² and Mariela Segura^{1*}.

¹Laboratory of Immunology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada; ²Center for Molecular and Translational Human Infectious Diseases Research, The Methodist Hospital Research Institute, 6565 Fannin, Houston, Texas 77030, USA

Running title: *S. suis* interactions with dendritic cells

Keywords: *Streptococcus suis*; dendritic cells; cell wall, capsular polysaccharide; complement

* Corresponding author. Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada. Tel.: +1 450 773 8521, ext. 0080; fax: +1 450 778 8108.

Abstract

Streptococcus suis is an emerging zoonotic agent of septicemia and meningitis. Knowledge on host immune responses toward *S. suis* and strategies used by this pathogen for subversion of these responses is scarce. Here, *S. suis* modulation of dendritic cell (DC) functions were assessed for the first time. Using *S. suis* knockout mutants in capsular polysaccharide (CPS) expression, it was shown that CPS blocks DC phagocytosis and impairs cytokine release by hindering cell wall components. Mutants impaired in D-alanylation of lipoteichoic acid (LTA) or N-deacetylation of peptidoglycan (PG) further demonstrated the importance of cell wall in modulation of DC activation. Notably, LTA/PG modifications were identified as major players in resistance to complement-dependent killing by DCs. Finally, *S. suis* hemolysin was partially involved in cytokine release and also contributed to bacterial escape of opsonophagocytosis. Overall, *S. suis* uses its arsenal of virulence factors to modulate DC functions and escape immune surveillance.

Abbreviations

bmDC	bone marrow-derived dendritic cell	LAMP-1	lysosomal-associated membrane protein-1
CFU	Colony-forming unit	LDH	lactate deshydrogenase
CPS	capsular polysaccharide	LPS	lipopolysaccharide
CCL	chemokine ligand	LTA	lipoteichoic acid
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand	MHC	major histocompatibility complex
CW	cell wall	MOI	multiplicity of infection
DC	dendritic cell	PE	phycoerythrin
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	PG	peptigoglycan
FACS	fluorescence-activated cell sorting	SEM	scanning electron microscopy
FITC	fluorescein isothiocyanate	TEM	transmission electron microscopy
IL	interleukin	TLR	Toll-like receptor
		TNF	tumor necrosis factor

Introduction

Streptococcus suis serotype 2 is a major swine pathogen mainly associated with meningitis and septicemia (1, 2). Until recently, *S. suis* disease in humans was considered rare, mostly affecting people in contact with swine or pork by-products. However, *S. suis* is now emerging as an important threat to human health, especially in Asia. *S. suis* is identified as the leading cause of adult meningitis in Vietnam, the second in Thailand, and the third in Hong Kong. In 2005, an important outbreak in China resulted in more than 200 human cases with a 20% fatality rate. Patients presented with symptoms associated with streptococcal toxic shock-like syndrome, including hemorrhage and coma (1).

S. suis pathogenesis of infection is poorly understood, and attempts to control the infection are hampered by lack of effective vaccines. Notably, low specific antibody production is generated during *S. suis* infection (3). However, mechanisms involved in innate and adaptive immune responses toward *S. suis* remain essentially unknown. Increased severity of *S. suis* infections in humans underscores the critical need to better understand the interactions between *S. suis* and the immune system to generate an effective immune response against this pathogen.

Several virulence factors have been proposed. The capsular polysaccharide (CPS) is considered a critical antiphagocytic factor (2, 4, 5). The serotype 2 CPS structure was recently described (6) and is composed of 5 different sugars, including sialic acid. Among several proteins (7), a hemolysin, suilysin, has been characterized as a cholesterol-binding cytolysin (7, 8). Suilysin is involved in modulation of *S. suis* interactions with different host cells (2, 7). Modifications of cell wall (CW) components such as the N-deacetylation of peptidoglycan (PG) and the D-alanylation of lipoteichoic acid (LTA) also contribute to *S. suis* virulence, as demonstrated in mouse and pig models of infection (9, 10). Because CPS, CW modifications, and suilysin seem to be involved in the virulence of *S. suis*, particularly by impairing critical steps in antigen processing such as phagocytosis and killing, we chose to study their role in modulation of dendritic cell (DC) functions.

DCs are powerful antigen-presenting cells that capture and process antigens, undergo a maturation process characterized by cytokine production and upregulation of costimulatory molecules, and finally migrate to adjacent lymphoid organs to activate T cells

(11). DCs are key elements in induction of innate immunity against pathogens and are crucial for T-cell priming and initiation of adaptive responses. Consequently, interactions between DCs and pathogens can strongly influence disease outcome.

Previously, we demonstrated that the mouse model of infection is a valid model to reproduce *S. suis* infection (12). In this study, we used mouse bone marrow–derived DCs (bmDCs) to investigate the capacity of *S. suis* to interact with DCs and to induce their maturation and activation. We also examined the contribution of known virulence factors on these interactions.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used are listed in Table 1. *S. suis* strains were grown as previously described (4) and diluted in complete cell culture medium before experiments. The number of colony-forming units (CFU)/mL in the final suspension was determined using Autoplate 4000 (Spiral Biotech).

Construction of the $\Delta cpsF$ mutant

A non-encapsulated mutant was constructed in wild-type strain P1/7 by precise, in-frame deletion of the *cpsF*/SSU_0520 gene using splicing-by-overlap-extension polymerase chain reaction (PCR) (13). The $\Delta cpsF$ deletion allele was cloned into plasmid pCR2.1 (Invitrogen), extracted with BamHI and PstI and recloned into thermosensitive *Escherichia coli*–*S. suis* shuttle plasmid pSET4s (14). *E. coli* transformation was performed as reported previously (15). Procedures for *S. suis* electroporation and $\Delta cpsF$ mutant isolation were previously described (14). Allelic replacement was confirmed by PCR and sequencing analysis with a 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The non-encapsulated phenotype was confirmed by transmission electron microscopy (TEM) using polycationic ferritin labeling, as reported (16).

Table I. Bacterial Strains and Plasmids

Strain/plasmid	General characteristics	Source/reference
<u>Escherichia coli</u>		
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
<u>Streptococcus suis</u>^a		
31533	Wild-type, highly virulent strain isolated from a pig with meningitis. Serotype 2	(45)
B218	Nonencapsulated mutant strain derived from 31533	(30)
Δ <i>dltA</i>	Mutant deficient for the D-alanylation of LTA. Derived from strain 31533	(9)
Δ <i>pgdA</i>	Mutant deficient for the N-deacetylation of PG. Derived from strain 31533	(10)
Δ <i>sly</i>	Suilysin-negative strain derived from strain 31533	(46)
P1/7	Wild-type, highly virulent strain isolated from a pig with meningitis. Serotype 2	(47)
Δ <i>cpsF</i>	Nonencapsulated mutant strain derived from P1/7. In frame deletion of <i>cpsF</i>	Current study
<u>Plasmids</u>		
pCR2.1	Ap ^r , Km ^r , <i>oriR</i> (f1) MCS <i>oriR</i> (ColE1)	Invitrogen
pSET4s	Thermosensitive vector for allelic replacement in <i>S. suis</i> . Replication functions of pG+host3, MCS <i>oriR</i> pUC19 <i>lacZ</i> Sp ^R	(48)
p4 Δ <i>cpsF</i>	pSET4s carrying the construct for <i>cpsF</i> allelic replacement	

a. Strain 31533 is a well-characterized representative virulent suilysin-positive *S. suis* serotype 2 strain used in previous studies (1, 2, 31, 49). Strain P1/7 is a virulent *S. suis* serotype 2 strain whose genome was recently sequenced (50). *DdltA*, *DpgdA*, and *Dsly* mutants present a normal morphology and are as encapsulated as the wild-type strain (9, 10). *DdltA*, *DpgdA*, *DcpsF*, and B218 mutants present the same hemolytic activity due to the release of suilysin as the wild-type strain (data not shown).

Abbreviations: LTA, lipoteichoic acid; PG, peptidoglycan.

BmDC generation

Female C57BL/6 mice (Charles River Laboratories) were used to generate bmDCs, as described previously (17). Experiments were conducted in accordance with the University of Montreal Animal Welfare Committee guidelines and policies. In brief, bone marrow cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, and 50 μ M 2-mercaptoethanol (Gibco). Complete medium was complemented with 20% granulocyte macrophage–colony stimulating factor from mouse-transfected Ag8653 cells (17). On day 8, after a subculture step, cells were collected and used as immature bmDCs. Cell purity was 85%–88% CD11c⁺ cells, as reported previously (17). For confirmation, bmDCs were further purified to >95% purity by positive selection using anti-CD11c microbeads (Miltenyi Biotec) (18).

Bactericidal assay

Bacteria were either not opsonized or were opsonized using 20% of either heat-inactivated normal mouse serum or complete normal mouse serum in phosphate-buffered saline for 30 minutes at 37°C with shaking. BmDCs (2×10^6 cells/mL) were mixed with different *S. suis* strains (2×10^4 CFU/mL) in microtubes and incubated for 6 h at 37°C with 5% CO₂. Assay conditions were chosen based on the kinetics of *S. suis* killing by bmDCs (data not shown). After incubation, cells were lysed and viable bacterial counts performed. Tubes with bacteria alone were treated similarly and used as controls.

BmDC stimulation assay

BmDCs were stimulated with 1 μ M CpG (ODN 1826, InvivoGen) as positive control, or *S. suis* strains (10^6 CFU/mL; initial infection ratio of 1:1). In selected experiments, bacterial strains were opsonized as described above. At different times after infection, supernatants were collected for cytokine quantification by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using pair-matched antibodies from R&D Systems or eBioscience. Cells were analyzed for costimulatory molecule expression by fluorescence activated cell sorting (FACS). The lactate dehydrogenase (LDH) assay was used to measure cytotoxicity levels (CytoTox96, Promega) as described (5). Final assay conditions were selected based on kinetics studies and absence of cytotoxicity (data not shown).

FACS analysis

Cells were treated for 30 minutes on ice with FcR-blocking reagent (FcγIII/II R_c Ab, BD Pharmingen) and then incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled antimouse CD11c monoclonal antibody (mAb) for 1 hour followed by 1 hour of staining with PE-labeled mAb against CD80 (clone 16-10A1), CD86 (clone GL1), CD40 (clone 3/23), CD54 (clone 3E2), or major histocompatibility complex (MHC) class II (A_β^b; clone AF6-120.1) from BD Pharmingen. Flow cytometry was performed using a FACSCalibur instrument and BD CellQuest TM Pro Version 4.0.2 (BD Biosciences).

Confocal and electron microscopy

For confocal analysis, after 2 h of bacteria-cell contact, cells were washed and fixed with methanol/acetone (80:20) for 20 minutes at -20°C, blocked, and incubated for 1 hour with rabbit anti-*S. suis* serum and rat anti-LAMP1 antibody (Developmental Studies Hybridoma Bank). Coverslips were then incubated with Alexa Fluor 488 goat antirabbit immunoglobulin G (IgG) and Alexa Fluor 568 goat antirat IgG (Invitrogen) for 30 minutes and mounted on glass slides with moviol containing DABCO and DAPI. Immunofluorescence studies were also performed to determine levels of complement deposition on bacteria. Either a bovine serum albumin solution or complete normal mouse serum was added for 30 minutes at 37°C to a 10⁶ bacterial suspension. In some cases, serum was pretreated with purified suilysin for 30 minutes at 37°C before opsonization. Bacteria were then washed and incubated with goat IgG fraction to mouse complement C3 (MP Biomedicals) for 1 hour, followed by Alexa Fluor 488 mouse antigoat IgG for 30 minutes. Samples were analyzed with a FV-1000 confocal microscope and Fluoview software. For TEM and scanning electron microscopy, bmDCs incubated with *S. suis* for 4 h were washed, fixed, and processed as reported previously (19).

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM and were analyzed for significance using unpaired Student *t* test. A *P* value < .05 was used as a threshold for significance. Experiments were repeated at least 3 times.

RESULTS

CW modifications and suilysin are important for S. suis resistance to killing by bmDCs

First, we confirmed that all mutant strains present similar growth curves as their respective wild-type parental strains (Fig. 1A). As shown in Fig. 1B, the wild-type strains were highly resistant to killing, and the presence of serum slightly, but not significantly, increased killing levels. Conversely, both non-encapsulated mutant strains were largely destroyed in all conditions tested. Thus, killing of non-encapsulated strains is not strictly dependent on serum factors. In contrast, the $\Delta dltA$, $\Delta pgdA$, and Δsly strains were all resistant to killing in the absence of opsonization or after opsonization with heat-inactivated serum but were significantly more susceptible to killing following complete serum opsonization.

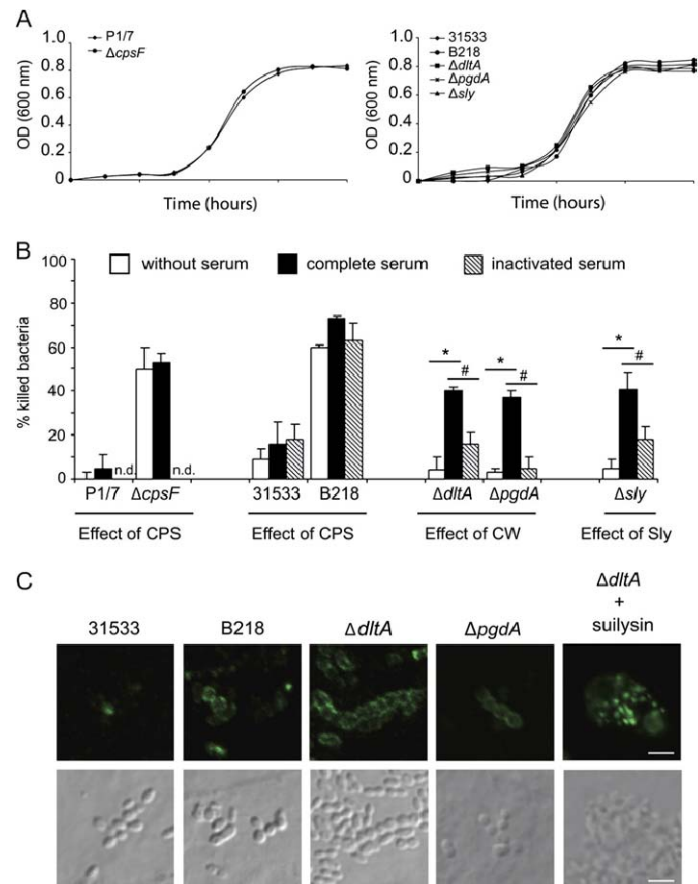


Fig. 1. Growth curves of *S. suis* strains and effect of complement deposition.

(A) Growth curves of *S. suis* wild-type P1/7 and its non-encapsulated mutant strain (left). Growth curves of *S. suis* wild-type 31533 and mutant strains (right). (B) Effect of serum on the capacity of bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs) to kill different *S. suis* strains. Bacteria were either nonopsonized or preopsonized with 20% complete serum or 20% heat-inactivated serum for 30 minutes prior to incubation with bmDCs for 6 h. Data are expressed as mean percentage (\pm SEM) of killed bacteria. * $P < 0.05$ indicates statistically significant differences between nonopsonized strains and their respective serum-opsonized counterparts. # $P < 0.05$ denotes significant differences between values obtained with serum-opsonized bacteria vs those

obtained with heat-inactivated serum. (C) Confocal microscopy showing complement deposition on *S. suis*. The wild-type 31533 strain, the non-encapsulated B218 mutant, the $\Delta dltA$ strain, or the $\Delta pgdA$ strain was preopsonized with complete serum and then incubated with an antibody against mouse complement component C3 to observe complement deposition. To assess the role of suilysin in complement deposition, complete serum was pretreated with 0.2 $\mu\text{g/mL}$ of purified suilysin. Suilysin-treated serum was then used for opsonization of the $\Delta dltA$ strain. Original magnification 150 \times . Scale bar, 4 μM (scale bar applies to all panels). CPS, capsular polysaccharide; CW, cell wall; n.d., not done; OD, optical density; Sly, suilysin.

Impairment of complement deposition by CW modifications, suilysin, and CPS

C3 deposition on streptococci was examined by immunofluorescence (Fig. 1C). Wild-type streptococci showed almost complete absence of C3 deposition, whereas increased labeling was observed on non-encapsulated strain surface. The $\Delta dltA$ and $\Delta pgdA$ strains showed bright cell contour labeling, indicating high levels of C3 deposition. Because suilysin is a secreted toxin, its role in C3 deposition cannot be analyzed with washed bacteria. To overcome this constraint, we pretreated complete normal serum with increasing doses of purified suilysin. Suilysin-treated serum was then used to opsonize the $\Delta dltA$ mutant strain, which should report high levels of C3 deposition. Using this system, we observed that suilysin pretreatment of serum resulted in markedly reduced levels of C3 deposition on $\Delta dltA$ bacteria.

*Encapsulated wild-type *S. suis* escapes internalization by DCs*

Confocal microscopy was performed using serum against *S. suis* and an antibody against LAMP1 (lysosomal-associated membrane protein 1) (Fig. 2A). Under nonopsonic conditions, few internalized bacteria were noticeable for the wild-type strain 31533 and the mutants Δsly , $\Delta dltA$, and $\Delta pgdA$. When these strains were opsonized with complete serum, internalization by bmDCs showed a minor increase for wild-type 31533 strain. This increase was more marked for $\Delta dltA$, $\Delta pgdA$, and Δsly mutants (Fig. 2A, middle panels). Opsonization with heat-inactivated serum partially restored internalization levels to those observed under nonopsonic conditions (Fig. 2A, lower panels). In contrast, the non-encapsulated mutant was highly internalized by bmDCs under all conditions tested. This is in agreement with bactericidal test results.

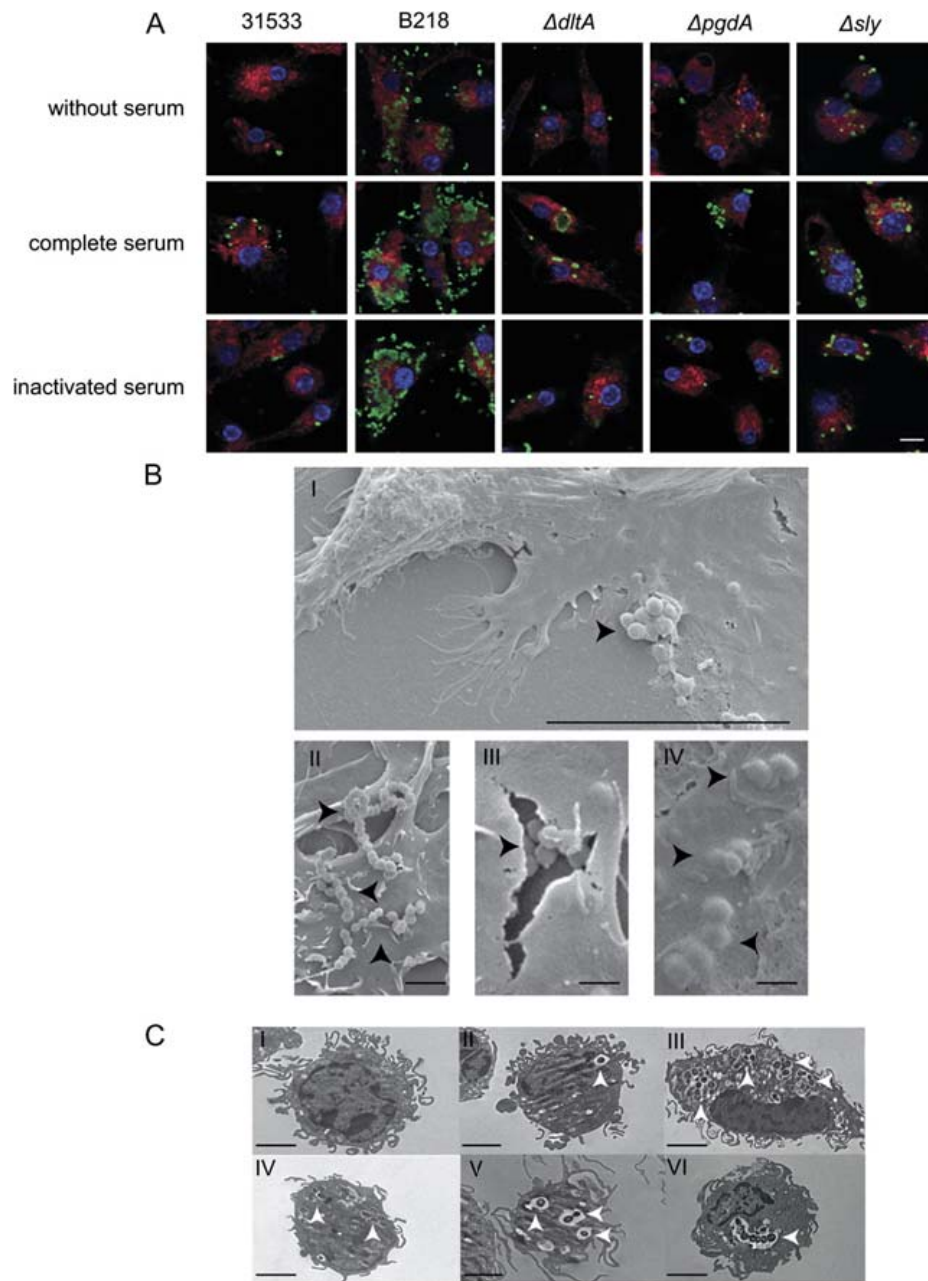


Fig. 2. Internalization of *S. suis* in DCs.

(A) Confocal microscopy showing internalization of *S. suis*. Bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs) were incubated with the wild-type strain 31533, the non-encapsulated mutant B218, the $\Delta dltA$ strain, the $\Delta pgdA$ strain, or the Δsly strain, not opsonized (*top panels*) or preopsonized with complete serum (*middle panels*) or heat-inactivated serum (*lower panels*). After a bacteria-cell contact of 2 h, cells were fixed and labeled with serum against *S. suis* (Alexa Fluor 488, green) and an antibody specific for LAMP1 (Alexa Fluor 568, red). DAPI was used to stain the nuclei (blue). Original magnification 60 \times . Scale bar, 10 μ M (scale bar applies to all panels). (B)

Scanning electron micrographs showing interactions between bmDCs and *S. suis* (10^7 colony-forming units [CFU]/mL) after a bacteria-cell contact time of 4 h. (I) BmDCs incubated with wild-type strain 31533 show very few cocci on the cell surface. BmDCs incubated with the non-encapsulated strain B218 show several cocci adhering to the cells (II) and underneath the cell surface (III and IV). Arrowheads show bacterial cells. (I) Scale bar, 10 μ m. Original magnification, 5000 \times . (II–IV) Scale bar, 1 μ m. Original magnification, 5000 \times . (C) Transmission electron micrographs showing internalization of *S. suis* by bmDCs (10^7 CFU/mL) after a bacteria-cell contact of 4 h. (I) Noninfected DC. (II) Most bmDCs were free of *S. suis* or contained very few bacteria when incubated with serum-opsonized wild-type strain 31533. (III) BmDCs incubated with serum-opsonized strain B218 contained high numbers of internalized bacteria. BmDCs incubated with opsonized strain $\Delta dltA$ (IV), $\Delta pgdA$ (V), or Δsly (VI) contained more internalized bacteria compared with bmDCs incubated with the wild-type strain. Arrowheads show internalized bacteria. Scale bar, 2 μ m. Original magnification, 10000 \times .

SEM showed that *S. suis* interacts with bmDCs. Cocci were found associated to the cell surface both for the wild-type strain and its non-encapsulated mutant (Fig. 2B). The CPS might impair *S. suis* interactions with bmDCs because the non-encapsulated strain seemed to adhere more than the wild type to DCs. Compared to the high numbers of streptococci observed intracellularly with the non-encapsulated mutant, TEM analysis showed that few bmDCs contained wild-type strain 31533 cocci despite serum opsonization (Fig. 2C, II and III). In agreement with aforementioned data, bmDCs incubated with the opsonized $\Delta dltA$, $\Delta pgdA$, or Δsly strain showed more bacteria internalized than the wild-type strain (Fig. 2C, IV–VI).

S. suis virulence factors regulate bmDC release of several cytokines

S. suis stimulation of bmDCs resulted in time-dependent cytokine release (data not shown). At 16 h after stimulation, *S. suis* wild-type strain-stimulated bmDCs produced significant amounts of interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-12p70, IL-23, IL-10, CXCL1, CCL2, CXCL9, and CXCL10 (Fig. 3). Non-encapsulated mutants induced significantly higher levels of all cytokines, except for IL-1 β and CCL2 (Fig. 3C–J). The $\Delta dltA$ and $\Delta pgdA$ mutants induced reduced levels of IL-10, IL-12p70, and CXCL10 (Fig. 3D–H), while the Δsly mutant induced lower levels of IL-12p70 and IL-10 (Fig. 3D and E). Main cytokine results were confirmed with bmDCs purified by magnetic cell sorting (data not shown).

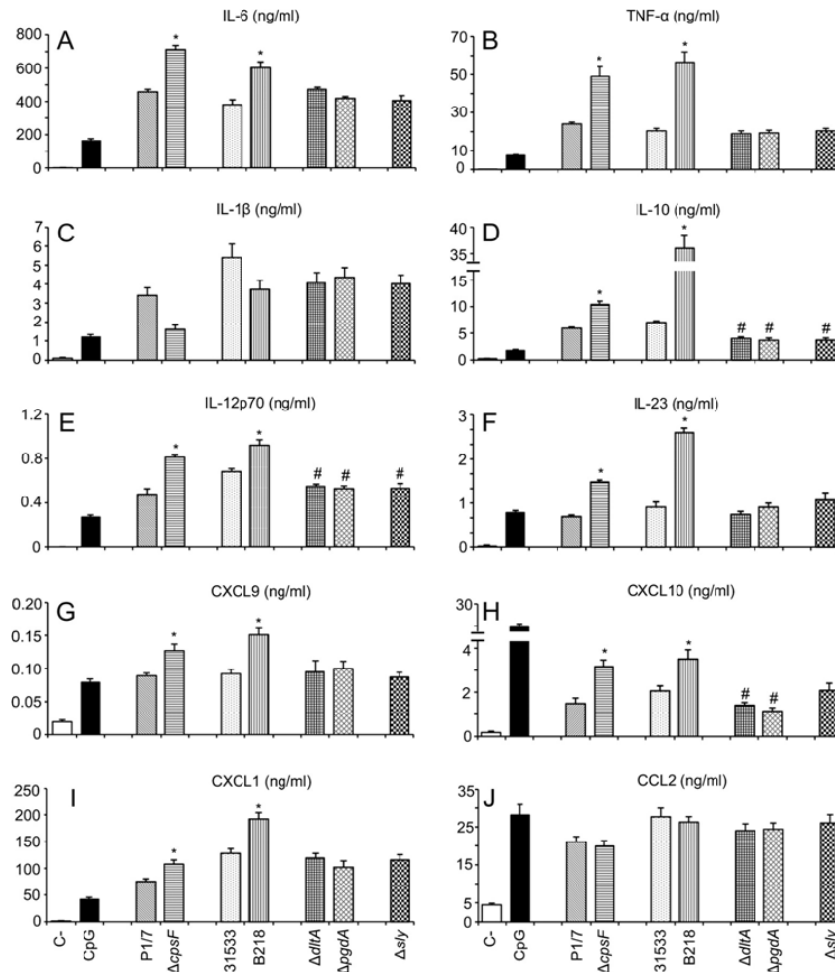
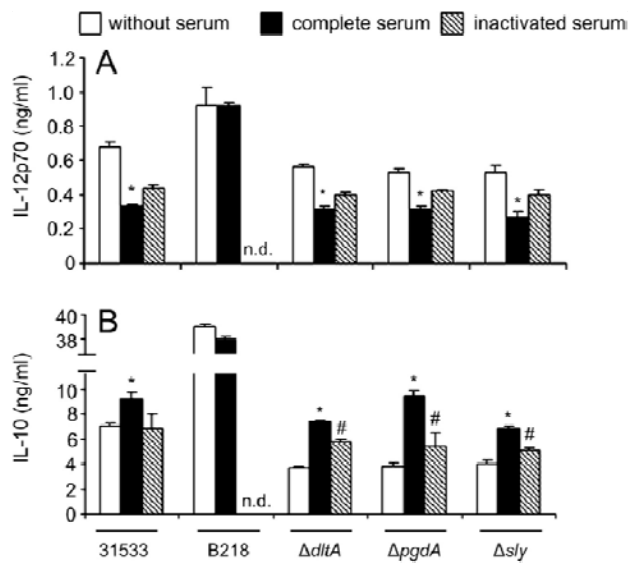


Fig. 3. Cytokine production by bone marrow-derived DCs in response to stimulation by *S. suis* strains.

Cytokine production by bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs) (10^6 cells/mL) in response to stimulation by CpG (1 μM) and different nonopsonized *S. suis* strains (10^6 colony-forming units [CFU]/mL) for 16 h. Nonstimulated cells served as negative control (C-). Sample dilutions giving optical density readings in the linear portion of the enzyme-linked immunosorbent assay standard curves were used to quantify cytokine levels. Data are expressed as mean \pm SEM and were analyzed for significance using unpaired Student *t* test. Experiments were repeated 4 times with 2 technical replicates. * $P < 0.05$ denotes values obtained with the non-encapsulated mutants that are significantly higher from those obtained with their respective wild-type strains. # $P < 0.05$ denotes values that are significantly lower than those obtained with the wild-type strain. Detection limits of cytokines: interleukin (IL)-1β, 0.03 ng/mL; IL-6, 0.125 ng/mL; IL-10, 0.0625 ng/mL; IL-12p70, 0.078 ng/mL; IL-23, 0.0625 ng/mL; tumor necrosis factor (TNF)-α, 0.125 ng/mL; CXCL1, 0.05 ng/mL; CXCL9, 0.0625 ng/mL; CXCL10, 0.0625 ng/mL; CCL2, 0.0625 ng/mL.

Serum modulates cytokine release by *S. suis*–activated bmDCs

Serum opsonization was shown to significantly modify IL-12p70 and IL-10 production by bmDCs (Fig. 4). For the $\Delta dltA$, $\Delta pgdA$, and Δsly mutants, the complement cascade seems to be involved, at least in part, in the observed downregulation of IL-10 production because bmDC stimulation with these mutants opsonized with heat-inactivated serum



significantly reduced its effect. In the case of IL-12p70, when these *S. suis* mutant strains were opsonized with heat-inactivated serum, there was a tendency, albeit not significant, to return to normal levels of this cytokine production. Thus, the involvement of other serum components in modulation of cytokine production cannot be excluded. Serum opsonization of the non-encapsulated mutant had no visible effect on cytokine production.

Fig. 4. Effect of serum on interleukin IL-12p70 and IL-10 production by bone marrow–derived DCs.

S. suis strains (10^6 colony-forming units [CFU]/mL) were either nonopsonized or preopsonized with 20% complete serum or 20% heat-inactivated serum for 30 minutes prior to incubation with bone marrow–derived dendritic cells (bmDCs) for 16 h. Data are expressed as mean \pm SEM and were analyzed for significance using unpaired Student *t* test. Experiments were repeated 4 times with 2 technical replicates. * $P < 0.05$ indicates statistically significant differences between nonopsonized strains and their respective serum-opsonized counterparts. # $P < 0.05$ denotes significant differences between values obtained with serum-opsonized bacteria vs those obtained with heat-inactivated serum.

S. suis induces bmDC expression of maturation markers

The ability of *S. suis* to increase expression of CD40, CD54, CD80, CD86, and MHC class II (MHC-II) on bmDCs was analyzed. No significant changes in CD54 and CD80 expression were observed (data not shown). However, as shown in Fig. 5, *S. suis*–

stimulated bmDCs showed higher expression of CD40. Two well-segregated sub-populations, a CD86^{high} and MHC-II^{high} subset and a CD86^{low} and MHC-II^{low} subset, were observed among the CD11c+ bmDCs population, as reported previously (17). *S. suis* stimulation resulted in higher percentages of CD86^{high} and MHC-II^{high} sub-populations compared with control cells. No differences were observed between the wild-type strain and the mutants (Fig. 5, gray-filled histograms). Only a slight decrease, albeit reproducible, in the expression of CD40, CD86, and/or MHC-II was discernible when bmDCs were incubated with opsonized *S. suis* strains (Fig. 5, black line histograms).

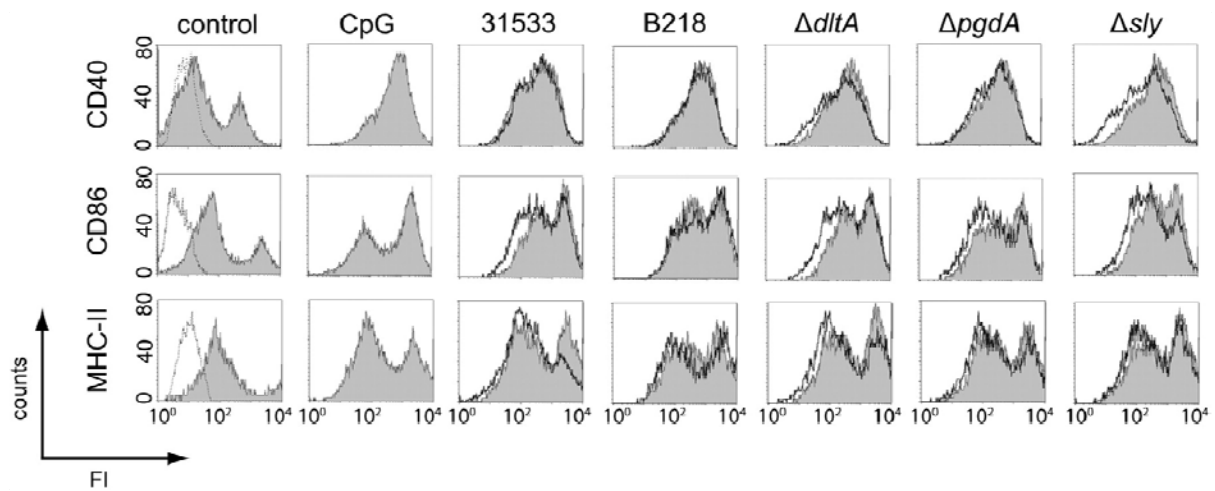


Fig. 5. Expression of surface markers by bone marrow-derived DCs stimulated with *S. suis*

Expression of surface markers by bone marrow-derived dendritic cells (bmDCs) stimulated with CpG (1 μ M) or *S. suis* (10^6 colony-forming units [CFU]/mL) for 16 h. *S. suis* strains were either nonopsonized or preopsonized with 20% complete serum for 30 minutes prior to incubation with bmDCs for 16 h. Unstimulated bmDCs served as control. Twenty thousand gated events were acquired per sample. Quadrants were drawn based on fluorescein isothiocyanate (FITC)- and PE-control stains and were plotted on logarithmic scales. CD40, CD86, and major histocompatibility complex class II (MHC-II) histograms were obtained by gating cells based on positive CD11c staining. FI, fluorescence intensity. Dotted line, isotype control; gray-filled histograms, data obtained with nonopsonized strains; black line histograms, data obtained with serum-opsonized strains. Data are representative of 3 independent experiments.

Discussion

Although *S. suis* is a pathogen of increasing importance for human health, mechanisms leading to an efficient immune response against *S. suis* are poorly understood. A typical type 1 inflammatory response was observed in an *S. suis* mouse model of septicemia and meningitis (12). However, interactions between *S. suis* and immune mediators have not been characterized. This work describes for the first time the interaction of *S. suis* with DCs and modulation of their maturation and activation.

Effective bacterial killing by DCs is generally assumed to require internalization, which in turn would have an impact on antigen presentation by DCs. However, we showed here that *S. suis* escapes this immune surveillance. Indeed, under nonopsonic conditions, the CPS is sufficient to protect *S. suis* from bmDC-mediated killing, confirming the role of CPS as an antiphagocytic factor (4, 5). Nonetheless, in the presence of serum, as normally occurs during natural infection, *S. suis* uses an arsenal of virulence factors to resist serum-mediated opsonophagocytosis and killing. Immunofluorescence confirmed that CPS, LTA, and PG modifications as well as suilysin all impair complement deposition on *S. suis*. Previous studies demonstrated suilysin contribution to *S. suis* resistance to complement-dependent killing by neutrophils (5, 7). One hypothesis suggested that the toxin might activate complement and reduce complement availability for bacterial opsonization, as previously shown with pneumolysin, a suilysin-related toxin produced by *Streptococcus pneumoniae* (20).

Another major finding is the involvement of CW modifications in resistance to complement-dependent killing. Typically, the CPS is considered the major factor interfering with complement activation, especially for sialic-acid-containing capsules, as is the case with *S. suis*. Sialylation of CPS is important for group B *Streptococcus* virulence because it has inhibitory effects on bacterial intracellular killing and acts by impairing complement deposition through sialic acid-dependent inhibition of the alternative pathway (21). This seems not to be the case for *S. suis* because $\Delta dltA$, $\Delta pgdA$, and Δsly mutants failed to resist opsonophagocytosis and killing despite the presence of an intact CPS. Generally, LTA D-alanylation is an important virulence factor for Gram-positive pathogens because it modulates bacterial surface charges, resistance to cationic peptides, and ligand binding (22). As such, charge compensation by D-alanylation reduces binding of complement

component C1q (23). Recently, LTA D-alanylation was reported as being important for *Streptococcus pyogenes* resistance to complement. The *dltA* inactivation in this pathogen leads to increased C3b deposition concomitant with reduced M protein expression (24). Although no M protein equivalent has been described for *S. suis* (8), increased C3b deposition is clearly observed in the *S. suis* $\Delta dltA$ mutant strain. The mechanism underlying this activity is still unknown.

Aside from *dltA*, to the best of our knowledge, this is the first time that N-deacetylation of PG is reported as involved in resistance to complement-dependent phagocytosis and killing. N-deacetylation of PG allows Gram-positive bacteria to circumvent host defenses, mainly by escaping Nod1/2 surveillance and/or increased resistance to lysozyme (25). A previous study revealed a significant contribution of *pgdA* to *S. suis* virulence traits. *S. suis* $\Delta pgdA$ mutant was shown to be highly attenuated in murine and porcine models of infection, following a severe impairment in its ability to persist in blood and escape neutrophil-mediated clearance (10). Modifications of PG, such as O-acetylation, were also shown to regulate ligand binding (26, 27). Experiments are ongoing to further investigate the importance of LTA D-alanylation and PG N-deacetylation in complement-dependent killing.

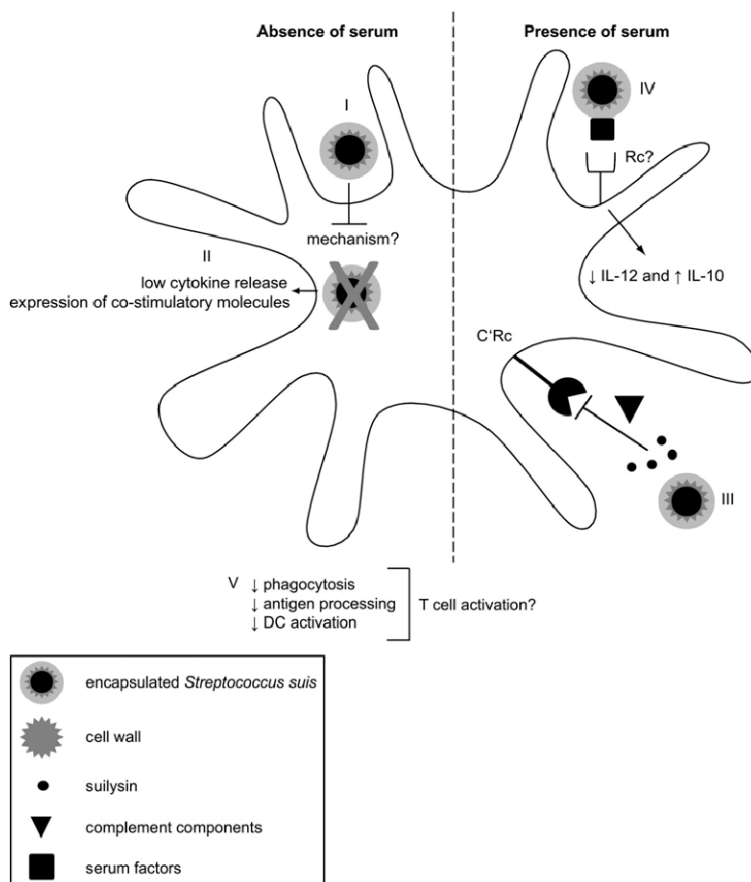
All *S. suis* strains triggered bmDC maturation, as shown by increased CD40, CD86, and MHC-II expression. No specific role could be attributed to any of the virulence factors tested because all strains induced equally the expression of costimulatory molecules by DCs. However, the strains tested differentially modulated the release of proinflammatory, Th1 driving and regulatory cytokines. In addition, high levels of the chemokines CXCL1, CXCL10, and CCL2 and low, albeit significant, levels of CXCL9 were observed. This is the first report on CXCL9, CXCL10, and IL-23 production following *S. suis* cell stimulation. CXCL9 and CXCL10 are involved in T- and NK-cell recruitment, while IL-23 is particularly efficient in supporting interferon- γ production and memory T-cell proliferation (28, 29). CPS interfered with the release of several cytokines but failed to modulate CCL2 and IL-1 β production. Previous studies showed that *S. suis* CPS is required for optimal CCL2 production by human monocytes, brain endothelial cells, and blood leukocytes (30-32). Increased exposure of CW components due to absence of CPS may account for higher capacity of non-encapsulated mutants to induce most cytokine secretion and confirm the role of CW components as major cytokine modulators (30, 32, 33). This is supported by the

fact that IL-12p70, IL-10, and CXCL10 release was diminished following bmDC stimulation by the CW mutants. Similarly, a *Streptococcus gordonii* mutant strain defective for LTA D-alanylation induced reduced IL-12p70, IL-10, IL-6, and TNF- α levels (34). Bacteria-derived LTA and PG have already been shown to be responsible for the release of CXCL10 by different cell types (35, 36). In addition to CW components, several microbial toxins can also modulate inflammatory pathways (37). In previous work with brain endothelial cells, *S. suis* suilysin was shown to contribute to IL-6 and IL-8 production (31). In our model, suilysin seems to significantly contribute to the release of the immunomodulatory cytokines IL-12p70 and IL-10. To date, the mechanism by which suilysin induces cytokine release remains unknown. *S. pneumoniae* pneumolysin recognizes Toll-like receptor (TLR) 4 on DCs (37). However, previous in vivo studies carried out in our laboratory indicate a strong TLR2 and CD14, but not TLR4, activation in the brains of mice infected with the suilysin-positive *S. suis* strain 31533 (12). Similar results were obtained in vitro with human monocytes (32).

S. suis opsonization with complete serum was found to downregulate IL-12 and upregulate IL-10 release. This modulation seems to be independent of *S. suis* uptake and killing levels by bmDCs since it is also noticeable with the wild-type strain, the susceptibility of which to phagocytosis/killing is only slightly increased in the presence of complete serum. *S. suis* activation of cytokine release by phagocytes has been reported as a phagocytosis-independent event (38, 39). We might hypothesize that increased ligation of receptors specific for serum factors might account for modulation of IL-12/IL-10 production ratio after DC activation with serum-opsonized bacteria. Since the non-encapsulated mutant is highly adherent to DCs (Fig. 2), the effect of serum factors is not noticeable for this strain. LPS inhibition of IL-12 production has been reported following ligation of macrophage Fc γ , complement, or scavenger receptors (40). The inhibitory effect observed was not dependent on particle internalization. Other studies reported that complement C1q regulates LPS-induced cytokine production in bmDCs and that iC3b is responsible for the induction of IL-10 and the downregulation of IL-12 in monocytes and DCs (41-43). Receptor-mediated inhibition of IL-12 production may be exploited by pathogens to suppress or delay cell-mediated immunity development. Serum factors and receptors involved in modulation of IL-12/IL-10 production after bmDC stimulation with opsonized *S. suis* remain to be characterized. Experiments with heat-inactivated serum showed only a partial role of complement factors in IL-10 upregulation when *S. suis* is impaired for CW modifications or suilysin production. The role of complement in IL-12 downregulation could not be clearly

demonstrated, and thus other serum factors might also be involved. This is certainly the case for wild-type *S. suis*, which is highly resistant to complement deposition. Moreover, IL-10 itself might contribute to the observed downregulation of IL-12 production. A slight tendency toward a reduction of costimulatory molecule expression was also repeatedly observed with bmDCs stimulated with serum opsonized strains. This tendency could also be the result of increased IL-10 production. For instance, a previous study showed that IL-10 induces the intracellular sequestration of MHC-II molecules (44).

To conclude, our results show for the first time that *S. suis* activates bmDCs and suggest that these cells might play a role in host innate and adaptive immunity during infection. However, *S. suis* possesses different virulence factors that modulate these interactions. Based on our results, a model of *S. suis* interactions with DCs is proposed (Fig. 6). The CPS acts as a physical barrier that protects bacteria from phagocytosis and reduces cytokine production levels. CW modifications of PG and LTA and suilysin further protect *S. suis* from complement-mediated clearance. Overall, this results in low bacterial uptake,



which might translate into reduced antigen processing and presentation to T cells. DC activation is additionally modulated by *S. suis* ligation to serum factors, which in turn reduces IL-12 production. We are presently evaluating the consequences of *S. suis* modulation of DC functions on the development of adaptive immune responses toward this pathogen.

Fig. 6. Proposed model of interactions between DCs and *S. suis*.

(I) In the absence of serum, the capsular polysaccharide (CPS) is sufficient to block *Streptococcus suis* phagocytosis by physical barrier and/or by inhibiting signaling pathways. (II) The presence of CPS further results in low cytokine release but normal costimulatory molecule expression. (III) In the presence of serum, the CPS, the cell wall, and the production of suilysin all contribute to reduce complement (C') deposition on *S. suis* and, consequently, the recognition by complement receptors (C' Rc), thus limiting complement-dependent clearance by dendritic cells (DCs). (IV) In addition, the binding of other serum factors to the surface of *S. suis* reduces the release of interleukin (IL)–12 and increases the release of IL-10 by DCs. (V) Overall, this results in low bacterial uptake, which might translate into reduced antigen processing and DC activation with further consequences on T-cell activation.

Acknowledgments

We are grateful to Dr P. Wilson (Vaccine Infectious Disease Organization, Saskatchewan, Canada) for providing purified suilysin. We thank Sonia Lacouture (GREMIP, Université de Montréal, Québec, Canada) for useful discussions and Diane Montpetit (CRDA, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada) for SEM analysis.

This work was supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (grants 342150-07 to M. S. and 154280 to M. G.) and a Discovery Accelerator Supplement (380299 to M. G.). M. S. is the recipient of a Fonds de recherche en santé du Québec Career Award. M.-P. L. is the recipient of doctoral awards from the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies and NSERC.

References

1. **Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M.** 2010. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol* **5**:371-391.
2. **Gottschalk M, Segura M.** 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* **76**:259-372.
3. **del Campo Sepulveda EM, Altman E, Kobisch M, D'Allaire S, Gottschalk M.** 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. *Vet Microbiol* **52**:113-325.
4. **Segura M, Gottschalk M, Olivier M.** 2004. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infect Immun* **72**:5322-5330.
5. **Chabot-Roy G, Willson P, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M.** 2006. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microb Pathog* **41**:21-32.
6. **Van Calsteren MR, Gagnon F, Lacouture S, Fittipaldi N, Gottschalk M.** 2010. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide. *Biochem Cell Biol* **88**:513-525.
7. **Baums CG, Valentin-Weigand P.** 2009. Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Anim Health Res Rev* **10**:65-83.
8. **Segura M, Gottschalk M.** 2004. Extracellular virulence factors of streptococci associated with animal diseases. *Front Biosci* **9**:1157-1188.
9. **Fittipaldi N, Sekizaki T, Takamatsu D, Harel J, Dominguez-Punaro Mde L, et al.** 2008. D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **76**:3587-3594.
10. **Fittipaldi N, Sekizaki T, Takamatsu D, de la Cruz Dominguez-Punaro M, Harel J, et al.** 2008. Significant contribution of the pgdA gene to the virulence of *Streptococcus suis*. *Mol Microbiol* **70**:1120-1135.
11. **Steinman RM.** 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**:271-296.
12. **Dominguez-Punaro MC, Segura M, Plante MM, Lacouture S, Rivest S, et al.** 2007. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* **179**:1842-1854.
13. **Warrens AN, Jones MD, Lechler RI.** 1997. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene* **186**:29-35.
14. **Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T.** 2001. Construction and characterization of *Streptococcus suis*-*Escherichia coli* shuttle cloning vectors. *Plasmid* **45**:101-113.
15. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
16. **Jacques M, Gottschalk M, Foiry B, Higgins R.** 1990. Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* **172**:2833-2838.
17. **Segura M, Su Z, Piccirillo C, Stevenson MM.** 2007. Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression. *Eur J Immunol* **37**:1887-1904.

18. **Ing R, Segura M, Thawani N, Tam M, Stevenson MM.** 2006. Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. *J Immunol* **176**:441-450.
19. **Vanier G, Segura M, Friedl P, Lacouture S, Gottschalk M.** 2004. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **72**:1441-1449.
20. **Alcantara RB, Preheim LC, Gentry-Nielsen MJ.** 2001. Pneumolysin-induced complement depletion during experimental pneumococcal bacteremia. *Infect Immun* **69**:3569-3575.
21. **Severi E, Hood DW, Thomas GH.** 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology* **153**:2817-2822.
22. **Neuhaus FC, Baddiley J.** 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:686-723.
23. **Loos M, Clas F, Fischer W.** 1986. Interaction of purified lipoteichoic acid with the classical complement pathway. *Infect Immun* **53**:595-599.
24. **Cox KH, Ruiz-Bustos E, Courtney HS, Dale JB, Pence MA, et al.** 2009. Inactivation of DltA modulates virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One* **4**:e5366.
25. **Vollmer W.** 2008. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol Rev* **32**:287-306.
26. **Franklin K, Clarke AJ.** 2001. Overexpression and characterization of the chromosomal aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase of *Providencia stuartii*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2238-2244.
27. **Dillard JP, Hackett KT.** 2005. Mutations affecting peptidoglycan acetylation in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **73**:5697-5705.
28. **Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, et al.** 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13**:715-725.
29. **de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML.** 2005. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* **26**:289-307.
30. **Segura M, Vanier G, Al-Numani D, Lacouture S, Olivier M, et al.** 2006. Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a whole-blood culture system. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**:92-106.
31. **Vanier G, Segura M, Lecours MP, Grenier D, Gottschalk M.** 2009. Porcine brain microvascular endothelial cell-derived interleukin-8 is first induced and then degraded by *Streptococcus suis*. *Microb Pathog* **46**:135-143.
32. **Graveline R, Segura M, Radzioch D, Gottschalk M.** 2007. TLR2-dependent recognition of *Streptococcus suis* is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness. *Int Immunol* **19**:375-389.
33. **Tanabe S, Gottschalk M, Grenier D.** 2008. Hemoglobin and *Streptococcus suis* cell wall act in synergy to potentiate the inflammatory response of monocyte-derived macrophages. *Innate Immun* **14**:357-363.
34. **Chan KG, Mayer M, Davis EM, Halperin SA, Lin TJ, et al.** 2007. Role of D-alanylation of *Streptococcus gordonii* lipoteichoic acid in innate and adaptive immunity. *Infect Immun* **75**:3033-3042.
35. **Durand SH, Flacher V, Romeas A, Carrouel F, Colomb E, et al.** 2006. Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. *J Immunol* **176**:2880-2887.

36. **Proost P, Vynckier AK, Mahieu F, Put W, Grillet B, et al.** 2003. Microbial Toll-like receptor ligands differentially regulate CXCL10/IP-10 expression in fibroblasts and mononuclear leukocytes in synergy with IFN-gamma and provide a mechanism for enhanced synovial chemokine levels in septic arthritis. *Eur J Immunol* **33**:3146-3153.
37. **Bernatoniene J, Zhang Q, Dogan S, Mitchell TJ, Paton JC, et al.** 2008. Induction of CC and CXC chemokines in human antigen-presenting dendritic cells by the pneumococcal proteins pneumolysin and CbpA, and the role played by toll-like receptor 4, NF-kappaB, and mitogen-activated protein kinases. *J Infect Dis* **198**:1823-1833.
38. **Segura M, Stankova J, Gottschalk M.** 1999. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infect Immun* **67**:4646-4654.
39. **Segura M, Vadeboncoeur N, Gottschalk M.** 2002. CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. *Clin Exp Immunol* **127**:243-254.
40. **Sutterwala FS, Noel GJ, Clynes R, Mosser DM.** 1997. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med* **185**:1977-1985.
41. **Waggoner SN, Cruise MW, Kassel R, Hahn YS.** 2005. gC1q receptor ligation selectively down-regulates human IL-12 production through activation of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Immunol* **175**:4706-4714.
42. **Luo X, Liu L, Tang N, Lu KQ, McCormick TS, et al.** 2005. Inhibition of monocyte-derived dendritic cell differentiation and interleukin-12 production by complement iC3b via a mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Exp Dermatol* **14**:303-310.
43. **Yoshida Y, Kang K, Berger M, Chen G, Gilliam AC, et al.** 1998. Monocyte induction of IL-10 and down-regulation of IL-12 by iC3b deposited in ultraviolet-exposed human skin. *J Immunol* **161**:5873-5879.
44. **Thibodeau J, Bourgeois-Daigneault MC, Huppe G, Tremblay J, Aumont A, et al.** 2008. Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *Eur J Immunol* **38**:1225-1230.
45. **Kobisch M, Gottschalk M, Morvan P, Cariolet R, Benevent G, et al.** 1995. Experimental infection of SPF piglets with *Streptococcus suis* serotype 2. *J Rech Porcine Fr* **27**:97-102.
46. **Lun S, Perez-Casal J, Connor W, Willson PJ.** 2003. Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microb Pathog* **34**:27-37.
47. **Slater JD, Allen AG, May JP, Bolitho S, Lindsay H, et al.** 2003. Mutagenesis of *Streptococcus equi* and *Streptococcus suis* by transposon Tn917. *Vet Microbiol* **93**:197-206.
48. **Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T.** 2001. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid* **46**:140-148.
49. **Vadeboncoeur N, Segura M, Al-Numani D, Vanier G, Gottschalk M.** 2003. Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**:49-58.
50. **Holden MT, Hauser H, Sanders M, Ngo TH, Cherevach I, et al.** 2009. Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *PLoS One* **4**:e6072.

ANNEXE II, ARTICLE VIII

“Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* capsular polysaccharides induce chemokine production by dendritic cells via Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent and -independent pathways”

Cynthia Calzas, Guillaume Goyette-Desjardins, Paul Lemire, Fleur Gagnon, Claude Lachance, Marie-Rose Van Calsteren and Mariela Segura.

Publié dans: *Infect Immun.* **2013** Sep;81(9):3106-3118.

DOI: 10.1128/IAI.00113-13.

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

J'ai participé partiellement aux expériences *in vitro* avec les DCs de l'article.

Group B *Streptococcus* and *Streptococcus suis* capsular polysaccharides induce chemokine production by dendritic cells via Toll-Like receptor 2- and MyD88-dependent and -independent pathways

Cynthia Calzas¹, Guillaume Goyette-Desjardins¹, Paul Lemire¹, Fleur Gagnon², Claude Lachance¹, Marie-Rose Van Calsteren² and Mariela Segura^{1*}.

¹Laboratory of Immunology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada; ²Food Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

Running title: Capsular polysaccharide interactions with dendritic cells

Keywords: Group B *Streptococcus*; *Streptococcus suis*; capsular polysaccharide; dendritic cells; cytokines

* Corresponding author. Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada. Tel.: +1 450 773 8521, ext. 0080; fax: +1 450 778 8108.

Abstract

Streptococcus agalactiae (also known as Group B *Streptococcus* [GBS]) and *Streptococcus suis* are encapsulated streptococci causing severe septicemia and meningitis. Bacterial capsular polysaccharides (CPSs) are poorly immunogenic, but anti-CPS antibodies are essential to the host defense against encapsulated bacteria. The mechanisms underlying anti-CPS antibody responses are not fully elucidated, but the biochemistry of CPSs, particularly the presence of sialic acid, may have an immunosuppressive effect. We investigated the ability of highly purified *S. suis* and GBS native (sialylated) CPSs to activate dendritic cells (DCs), which are crucial actors in the initiation of humoral immunity. The influence of CPS biochemistry was studied using CPSs extracted from different serotypes within these two streptococcal species, as well as desialylated CPSs. No interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-12p70, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), or IL-10 production was observed in *S. suis* or GBS CPS-stimulated DCs. Moreover, these CPSs exerted immunosuppressive effects on DC activation, as a diminution of gamma interferon (IFN- γ)-induced B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) expression was observed in CPS-pretreated cells. However, *S. suis* and GBS CPSs induced significant production of CCL3, via partially Toll-like receptor 2 (TLR2)- and myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-dependent pathways, and CCL2, via TLR-independent mechanisms. No major influence of CPS biochemistry was observed on the capacity to induce chemokine production by DCs, indicating that DCs respond to these CPSs in a patterned way rather than a structure-dedicated manner.

Abbreviations

Ab	antibody	IL	interleukin
APC	antigen-presenting cell	IFN	interferon
BAFF	B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family	LFA	<i>Limax flavus</i> agglutinin
bmDC	bone marrow-derived dendritic cell	LPS	lipopolysaccharide
CCL	chemokine ligand	MAL-1	<i>Maackia amurensis</i> leukoagglutinin
CPS	capsular polysaccharide	MyD88	myeloid differentiation factor 88
DC	dendritic cell	NMR	nuclear magnetic resonance
ELLA	enzyme-linked lectin assay	PRR	pattern recognition receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	RT-qPCR	reverse transcriptase quantitative PCR
FACS	fluorescence-activated cell sorting	SNA-1	<i>Sambucus nigra</i> agglutinin
GBS	Group B <i>Streptococcus</i>	TLR	Toll-like receptor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor	TNF	tumor necrosis factor
		WT	wild-type

Introduction

Streptococcus agalactiae (also known as Group B *Streptococcus* [GBS]) is a major cause of life-threatening invasive bacterial infections in pregnant women and neonates as well as in the elderly and immunocompromised individuals (1, 2). Clinical manifestations are mainly pneumonia, septicemia, and meningitis. Among 10 GBS serotypes identified, type III is one of the major serotypes associated with invasive neonatal infection and is the most common type in GBS meningitis (2). In addition, GBS type V is emerging as a leading cause of invasive disease in adults (3). *Streptococcus suis* is an important swine pathogen and an emerging zoonotic pathogen in humans that is able to induce septicemia with sudden death, meningitis, endocarditis, pneumonia, and arthritis (4, 5). Of the 35 serotypes, type 2 is the most virulent and is frequently isolated from both swine and humans (6), and type 14 is also emerging as a zoonotic threat (7). For both pathogens, the capsular polysaccharide (CPS), which defines the serotype, is considered the major virulence factor (8, 9). The structures of type III and V GBS CPSs are formed by different arrangements of the monosaccharides glucose, galactose, and *N*-acetylglucosamine into unique repeating units that contain a side chain terminated by sialic acid (*N*-acetylneuraminic acid [Neu5Ac]). The structures of type 2 and 14 *S. suis* CPSs are composed of the monosaccharides glucose, galactose, *N*-acetylglucosamine, and rhamnose (for type 2 only) arranged into a unique repeating unit that also contains a side chain terminated by sialic acid. In fact, these streptococci are the sole Gram-positive bacteria possessing sialic acid in their capsules (8, 10, 11). However, despite similarities in the compositions of the CPSs of these two bacterial species, each CPS is composed of a unique arrangement of these sugars conferring a distinct antigenicity. Moreover, sialic acid forms an α -2,6 linkage with the adjacent galactose in *S. suis*, in contrast to the α -2,3 linkage in GBS. Interestingly, the interplay of CPSs with components of the immune system, including antigen-presenting cells (APCs), seems to differ radically. Experiments using non-encapsulated mutants have shown that *S. suis* type 2 CPS has a strong antiphagocytic effect, in contrast to GBS type III CPS, and severely interferes with the release of most of the cytokines produced by *S. suis*-infected APCs. In the case of GBS type III, cytokine production is only partially modified or unaltered by the presence of its CPS (12-15).

Sialic acid of bacterial polysaccharides has been suggested to be involved in immune evasion via several mechanisms. For example, sialic acid of GBS type III CPS

interferes with the immune response by molecular mimicry (8) and inhibition of complement activation (16). Some receptors expressed on the surfaces of leukocytes have a distinct preference for specific types of linkage of sialic acid to subterminal sugars. As these binding preferences are likely related to their biological functions, differences in sialic acid linkage in *S. suis* versus GBS might differentially modulate host immune responses (17). However, knowledge on the specific contributions of sialic acid to the interactions of these two pathogens with the immune system is restricted by the fact that deletion of genes involved in sialic acid synthesis results in considerable or complete loss of CPS expression at the bacterial surface (18, 19).

Dendritic cells (DCs), the most powerful APCs, express a wide variety of pattern recognition receptors (PRRs) that enable them to detect the presence of several pathogens through the recognition of pathogen-associated molecular patterns. Among these PRRs, Toll-like receptors (TLRs) are important for the initiation of the immune response as well as the shaping of adaptive immunity (20). The interactions between DCs and pathogens can strongly influence the magnitude and phenotype of the ensuing cellular and humoral adaptive immune responses, notably via the release of cytokines (21). Purified bacterial CPSs are classically reported to be T cell-independent (TI) antigens which are consequently weak stimulators of the host immune response (22, 23). However, several *in vitro* studies have demonstrated the ability of bacterial CPSs to interact with APCs, resulting in the production of cytokines and chemokines (24-28). The adaptor molecule myeloid differentiation factor 88 (MyD88), which is involved in intracellular events downstream of TLR signaling, and TLR2 have been suspected to be involved in the interactions of bacterial CPSs with DCs and/or macrophages (25, 27). Nevertheless, the potential role of pure carbohydrates as ligands for TLRs, and more globally for PRRs, remains largely uninvestigated.

Recent reports have shown that DCs play an important role in TI responses and, more precisely, in the development of the humoral response, via the release of B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF). BAFF is able to enhance B cell proliferation, immunoglobulin (Ig) class switching, and Ig secretion (29, 30). These critical signals are particularly interesting in the context of infection by encapsulated bacteria, where antibodies (Abs) against the CPS have been proven to be essential to the host defense (23). As such, we hypothesized that intra- and interspecies structural differences in

CPS might differently modulate DC release of cytokines and chemokines. The goal of this study was thus to evaluate and compare the effects of highly purified CPS preparations from *S. suis* types 2 and 14 as well as GBS types III and V on DC activation and, more specifically, on the capacity to induce cytokines essential for the development of an effective humoral immune response. The influence of sialic acid was analyzed using chemically desialylated CPS preparations.

Materials and methods

Native CPS purification

The reference strains of *S. suis* serotype 2 (S735; ATCC 43765), isolated from a pig with meningitis (31), and *S. suis* serotype 14 (DAN13730), isolated from a human with meningitis (32), were grown in 150 ml of Todd-Hewitt broth (THB) (Oxoid, Thermo Fisher Scientific) at 37°C for 16 h, diluted to 6 liters in fresh THB, and grown to an optical density at 540 nm (OD₅₄₀) of 0.8. The cells were pelleted by centrifugation at 10,000 × *g* for 40 min, suspended by repeated pipetting in 33 mM phosphate-buffered saline (PBS), pH 8.0, and chilled. The CPSs were then purified as previously described (10, 11).

GBS serotype III strain COH-1, isolated from an infant with bacteremia (33), and GBS serotype V strain CJB111 (ATCC BAA-23), isolated from a neonate with septicemia, were used in this study. GBS CPSs were prepared as previously reported (34), with some modifications. Briefly, bacteria were grown in 200 ml THB at 37°C for 16 h, diluted to 8 liters in fresh THB, and grown to an OD₅₄₀ of 0.8. The cells were pelleted by centrifugation at 10,000 × *g* for 40 min, washed in PBS, pH 7.3, and treated with 1 N NaOH at 37°C overnight. After neutralization and dialysis, proteins were digested by treatment with 1 mg/ml pronase (Sigma-Aldrich) at 37°C overnight, followed by dialysis. The CPSs were then subjected to re-*N*-acetylation with 0.8 M acetic anhydride (Sigma) in 5 N NaOH and finally purified by gel filtration on Sephacryl S-300 (GE Healthcare), using 50 mM NH₄HCO₃ as the eluent.

CPS desialylation

Highly purified native CPSs were desialylated by mild acid hydrolysis as described previously (10). Briefly, CPS (8 mg) was heated in 1 ml of 70 mM HCl at 60°C for 250 min, neutralized with 2 M NH₄OH, dialyzed against deionized water for 48 h at 4°C with a Spectra/Por membrane (molecular size cutoff of 3,500 Da; Spectrum Laboratories), and freeze-dried.

CPS quality controls

Each purified CPS was subjected to rigorous quality control tests as previously described (10). Nucleic acids were quantified using an ND 1000 spectrometer (Nanodrop). The absorbance was measured at 230 and 260 nm. Calculations were done with Nanodrop software. According to the manufacturer, results are reproducible between 2 and 100 ng/μl. Proteins were quantified by use of a modified Lowry protein assay kit from Pierce on 1 mg/ml CPS samples, using a standard curve prepared with diluted albumin standards from 1 to 1000 μg/ml. The calculated limit of detection ($P \leq 0.05$) was 0.7 to 1.3 μg/ml. Each CPS was analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) as described below. The monosaccharide composition of polysaccharides was confirmed by methanolysis followed by acetylation and analysis by gas chromatography (GC), either with flame ionization detection or coupled to mass spectrometry as previously described (10). The weight-average molecular weight (M_w) of each CPS was determined by size-exclusion chromatography coupled with multiangle light scattering (SEC-MALS) as described below. The presence (native CPS) or absence (desialylated CPS) of sialic acid was verified by NMR and by an enzyme-linked lectin assay (ELLA) as described below.

Nuclear magnetic resonance assay

S. suis native CPSs were exchanged in phosphate buffer (p²H 8.0) in ²H₂O (99.9 atom% ²H), freeze-dried, and dissolved in ²H₂O (99.96 atom% ²H) to a final phosphate concentration of 33 mM. The other CPSs were exchanged in ²H₂O (99.9 atom% ²H), freeze-dried, and dissolved in ²H₂O (99.96 atom% ²H). NMR spectra were acquired on CPS samples at concentrations of ca. 1% to 2%. Conventional ¹H spectra were acquired at 14 T on Bruker Avance spectrometers equipped with either a 5-mm TCI CryoProbe at 50°C or a

5-mm PABBO BB inverse gradient probe at 75°C or at 11.75 T on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5-mm triple-resonance TBI probe at 60 to 80°C, using standard Bruker pulse sequences.

M_w characterization of native and desialylated CPSs

The M_w of CPSs were characterized by SEC-MALS. Chromatographic separation was performed with two 8-mm by 300-mm Shodex OHpak gel filtration columns connected in series (SB 806 and SB 804), preceded by an SB 807G guard column (Showa Denko). Elution was done with a Waters 510 pump (Waters), using a 0.1 M NaNO₃ mobile phase filtered through a 0.02-μm membrane (Whatman), at a flow rate of 0.5 ml/min. Samples were dissolved in the SEC eluent at concentrations of 0.7 to 1.0 mg/ml for native CPSs and 2.0 to 3.5 mg/ml for desialylated CPSs and then were injected with a 100- or 200-μl sample loop. Molecular masses were determined with a Dawn EOS MALS detector (Wyatt). A model RI 410 differential refractometer (Waters) was used as a concentration detector. A refractive index increment (dn/dc) of 0.137 ml/g was calculated for 690 nm, using data for xanthan at 436 and 546 nm (35), and the second virial coefficient (A_2) was taken as zero. Calculations were performed with ASTRA software, version 6.0.0.108 (Wyatt).

ELLA

In order to verify the presence or absence of sialic acid in the purified native and desialylated CPSs, ELLA was carried out based on a previously described technique (36), which was adapted to CPSs. Briefly, 200 ng of sample (native or desialylated CPS) was added to wells of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate (Nunc-Immuno Polysorp). After overnight coating at 4°C, the wells were washed and blocked by the addition of 1× Carbo-Free solution (Vector Laboratories). After washings, the wells were incubated for 1 h with biotinylated *Sambucus nigra* agglutinin (SNA-I) (Vector Laboratories), which specifically recognizes sialic acid as Neu5Acα-2,6-Galp/GalpNAc (37), or biotinylated *Maackia amurensis* leucoagglutinin (MAL-I) (Vector Laboratories), which recognizes sialic acid as Neu5Acα-2,3-Galβ-1,4-GlcNAc (38). Horseradish peroxidase (HRP)-labeled avidin D (Vector Laboratories) and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine were then added. In some experiments, HRP-conjugated *Limax flavus* agglutinin (LFA) (Vector Laboratories), which

recognizes Neu5Ac (39), was used. The enzyme reaction was stopped by the addition of 0.5 M H₂SO₄, and the absorbance was read at 450 nm with an ELISA plate reader.

Dot-ELISA.

Ten microliters of purified native or desialylated CPS (each at 1 mg/ml) or 10 µl of heat-killed whole bacteria was blotted on a polyvinylidene difluoride (PVDF) Western blot membrane (Roche). Heat-killed bacteria were obtained after incubating bacteria at 60°C for 45 min and were adjusted to 10⁹ CFU/ml. The membrane was blocked for 1 h with a solution of Tris-buffered saline (TBS) containing 2% casein, followed by 2 h of incubation with either the mouse monoclonal Ab (MAb) Z3, which specifically recognizes the sialic acid moiety of *S. suis* type 2 CPS (40); monospecific polyclonal rabbit sera against *S. suis* type 2 (41) or *S. suis* type 14 (32); or commercial rabbit sera against GBS type III or GBS type V CPS (Denka Seiken). The membrane was washed, and the appropriate anti-rabbit or anti-mouse HRP-conjugated Ab (Jackson) was added for 1 h. The membrane was washed 3 times with TBS and revealed with a 4-chloro-1-naphthol solution (Sigma).

Mouse strains and generation of bone marrow-derived dendritic cells

Six- to 8-week-old mice originating from Jackson Laboratory, including wild-type (WT) C57BL/6, MyD88^{-/-} (B6.129P2-Myd88^{tm1Defr}/J), and TLR2^{-/-} (B6.129-Tlr2^{tm1Kir}/J) mice, were used. All experiments involving mice were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* by the Animal Welfare Committee of the Université de Montréal. Bone marrow-derived DCs were produced according to a previously described technique (13, 42) and cultured in complete medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 2 mM l-glutamine, 50 µM 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin-streptomycin, and 20 µg/ml gentamicin. All reagents were from Gibco (Invitrogen). Cell purity was routinely ≥86 to 90% CD11c^{+high} F4/80^{-/dim} cells as determined by fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis, in agreement with values reported in other studies (43-45).

In vitro DC stimulation assay

DCs were resuspended at 10^6 cells/ml in complete medium and stimulated with native or desialylated CPS (5, 50, 100, or 200 $\mu\text{g/ml}$). At 6 and 24 h, supernatants were collected for cytokine quantification by ELISA, and cells were harvested for analysis of BAFF expression by reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR). Cells stimulated with 1 $\mu\text{g/ml}$ ultrapurified *Escherichia coli* O55:B5 lipopolysaccharide (LPS) (Apotech Corporation) and 10 ng/ml recombinant mouse gamma interferon (IFN- γ) (R&D Systems) served as positive controls for cytokine production and BAFF expression, respectively. Nonstimulated cells served as a negative control. In some experiments, DCs were prestimulated with CPS (at 200 $\mu\text{g/ml}$) for 6 h prior to incubation with 10 ng/ml IFN- γ for 24 h. Cells were then harvested for BAFF expression analysis. DCs preincubated in complete medium before addition of IFN- γ served as a control. All solutions and CPSs were tested for the absence of endotoxin by use of a *Limulus* amoebocyte lysate gel-clotting test (Pyrotell) with a sensitivity limit of 0.03 endotoxin unit (EU)/ml. Otherwise, the absence of endotoxin contamination during cell stimulation was controlled by parallel assays with polymyxin B sulfate (Sigma) at 20 $\mu\text{g/ml}$.

Cytokine quantification by ELISA

Levels of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-10, IL-12p70, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), CCL2 (MCP-1), and CCL3 (MIP-1 α) in cell culture supernatants were measured by sandwich ELISAs using pair-matched Abs from R&D Systems, performed according to the manufacturer's recommendations. Twofold dilutions of recombinant mouse cytokines were used to generate standard curves. Sample dilutions giving OD readings in the linear portion of the appropriate standard curve were used to quantify the levels of each cytokine.

Analysis of BAFF gene expression by real-time RT-qPCR

Total RNA was isolated from 10^6 DCs by use of TRIzol reagent (Invitrogen). After elimination of genomic DNA, 800 ng of total RNA was reverse transcribed with a QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen). The cDNA was amplified using an SsoFast EvaGreen Supermix kit (Bio-Rad). The PCR amplification program for all cDNAs consisted of an enzyme activation step of 3 min at 98°C followed by 40 cycles of a denaturing step of 2 s at

98°C and an annealing/extension step of 5 s at 56°C. The ATP synthase subunit beta (ATP5B) and cytochrome *c*₁ (CYC1) genes were used as normalizing genes to compensate for potential differences in amounts of cDNA. The primers used for amplification of the different target cDNAs are listed in Supplemental Table 1 in the supplemental material and were all tested to achieve amplification efficiencies between 98.5% and 100%. The primer sequences were all designed from the NCBI GenBank mRNA sequence, using the Web-based software primerquest from Integrated DNA Technologies. A Bio-Rad CFX-96 sequence detector was used for amplification of cDNA, and quantitation of differences between the different groups was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (46). Nonstimulated DCs were used as the calibrator reference in the analysis.

Statistical analysis

All data are expressed as means \pm standard errors of the means (SEM). Data were analyzed for significance using analysis of variance (ANOVA). Significance is denoted in the figures as follows: * $P < 0.05$; and ** $P < 0.001$. All experiments were repeated at least three times.

Results

S. suis and GBS CPS purification, desialylation, and quality control tests

On average, from a 6-liter *S. suis* type 2 or *S. suis* type 14 culture, 150 mg of crude capsule was obtained, to afford around 30 mg of purified CPS after gel filtration (average yield of 5 mg CPS/liter of culture). From 8 liters of GBS type III or type V culture, 360 mg or 600 mg initial crude capsule was obtained, respectively, to afford around 30 mg of purified CPS after gel filtration (average yield of 3.75 mg CPS/liter of culture). GC and NMR analyses of purified CPSs gave sugar compositions and structures in accord with previous findings (8, 10, 11) (Table 1; see Supplemental Fig. 1 and 2 in the supplemental material). Each repeating unit is composed of the same four sugars (with an additional rhamnose in *S. suis* type 2 CPS), with sialic acid located at the terminal side chain. The ratios of the four common sugars are similar in *S. suis* type 2 and 14 CPSs, whereas they are different

between GBS type III and V CPSs. In comparison with *S. suis* CPSs, the repeating unit of GBS type III and V CPSs has one less galactose, and GBS type V CPS has two additional glucose residues. Indeed, the glucose:galactose:*N*-acetylglucosamine:*N*-acetylneuraminic acid:rhamnose sugar ratios for each repeating unit of *S. suis* type 2, *S. suis* type 14, GBS type III, and GBS type V CPSs are 1:3:1:1:1, 1:3:1:1:0, 1:2:1:1:0, and 3:2:1:1:0, respectively (Table 1; see Supplemental Fig. 1 and 2). One of the problems encountered in purifying GBS CPSs is contamination with group B antigen, as the CPS is covalently linked to the cell wall in this bacterial species (47). The absence of rhamnose (a sugar present in group B antigen but not in GBS CPSs) in purified GBS CPS preparations confirmed the absence of contamination with this cell wall antigen. No protein was found above the limit of detection, indicating that there was less than 1.3% (wt/wt) protein in all purified CPSs, and DNA and RNA contamination was less than 1% (wt/wt) (Table 1). SEC-MALS showed that native *S. suis* type 2 and 14 CPSs had similar M_w , which were 480 and 500 kg/mol, respectively. Native GBS type III and V CPSs had comparable M_w , which were almost 4-fold lower than that of native *S. suis* CPSs. Desialylation induced a larger M_w decrease in *S. suis* CPSs than in GBS CPSs, with the highest diminution for desialylated *S. suis* type 2 CPS (96% of the initial M_w) (Table 1). This could be explained by the presence of rhamnose in the backbone of *S. suis* type 2 CPS, which forms a linkage more susceptible to acid hydrolysis with the adjacent sugar.

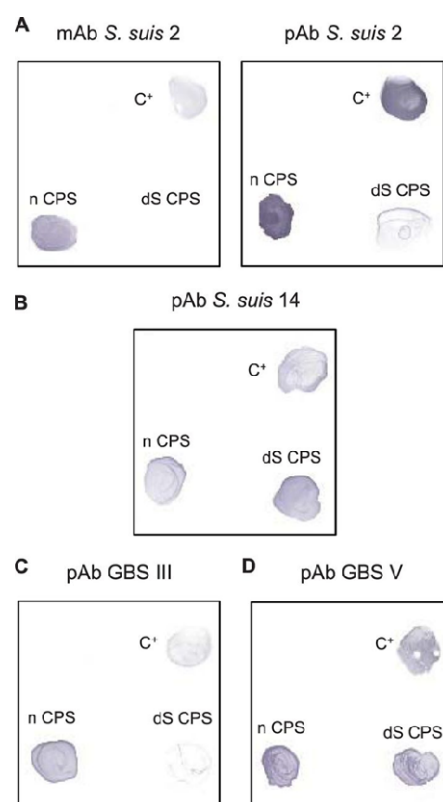
Table I. Quality control tests of purified *S. suis* and GBS CPSs^f

CPS ^a	Sugar composition ^b	M_w ^c	% (wt/wt) nucleic acids ^d	% (wt/wt) protein ^e
<i>S. suis</i> type 2 (n)	1:2.6:0.9:1.0:0.9	480	0.8	NS
<i>S. suis</i> type 2 (dS)	1:2.6:0.9:1.0:0.9	21	0.8	NS
<i>S. suis</i> type 14 (n)	1:2.5:0.8:1.0:0.0	500	0.7	NS
<i>S. suis</i> type 14 (dS)	1:2.5:0.8:1.0:0.0	176	0.7	NS
GBS type III (n)	1:1.5:1.0:0.9:0.0	108	0.8	NS
GBS type III (dS)	1:1.5:1.0:0.9:0.0	59	0.8	NS
GBS type V (n)	3:1.5:0.8:0.8:0.0	128	0.9	NS
GBS type V (dS)	3:1.5:0.8:0.8:0.0	91	0.9	NS

a. n, native; dS, desialylated; b. Determined by GC after methanolysis and acetylation and shown in the order glucose:galactose:*N*-acetylglucosamine:*N*-acetylneuraminic acid:rhamnose; c. Determined by SEC-MALS (expressed in kg/mol); d. Determined by spectrophotometry at 230 and 260 nm; e. Determined by spectrophotometry at 750 nm. NS, nonsignificant (under the limit of detection); f. See Materials and Methods for more details.

S. suis and GBS CPS recognition by specific sera and sialic acid-binding lectins

Dot-ELISA experiments on native CPSs showed that recognition of the CPS epitope of each CPS preparation was conserved after purification (Fig. 1). Whereas the native *S. suis* type 2 CPS was well recognized by MAb Z3, which is specific for the sialic acid part



of the capsule, the negative reaction of the desialylated *S. suis* type 2 CPS attested the absence of sialic acid in the latter (Fig. 1A, left panel). Desialylation of *S. suis* type 2 CPS resulted in reduced recognition by specific polyclonal Abs (Fig. 1A, right panel), whereas recognition of desialylated preparations of *S. suis* type 14 CPS was unaltered (Fig. 1B). The capacity of specific polyclonal Abs to react with the desialylated GBS type III CPS was almost completely lost compared to that with native CPS (Fig. 1C). In contrast, native and desialylated preparations of GBS type V CPS were similarly recognized by specific polyclonal Abs (Fig. 1D). These data suggest that there are intra- and interspecies variations in the immunogenic properties exerted by the sialic acid moiety (48-50).

Fig. 1. Recognition of *S. suis* and GBS CPSs by dot-ELISA.

S. suis type 2 (A), *S. suis* type 14 (B), GBS type III (C), or GBS type V (D) whole bacteria (10^7 CFU) or their respective purified native (n) or desialylated (dS) CPSs (10 μ g) were incubated with a MAb directed against the sialic acid moiety of *S. suis* type 2 CPS (A, left) or with monospecific polyclonal sera (pAb) against *S. suis* type 2 CPS (A, right), *S. suis* type 14 CPS (B), GBS type III CPS (C), or GBS type V CPS (D). C⁺, positive control.

To further confirm the presence or absence of sialic acid in native and desialylated CPSs, an ELLA test was performed. Recognition of native *S. suis* and GBS CPSs by LFA, which is specific for Neu5Ac, confirmed the integrity of sialic acid in these preparations, whereas the absence of reaction with desialylated preparations demonstrated the absence of this sugar after desialylation by mild acid hydrolysis (Fig. 2A). Recognition of native *S. suis* CPSs by SNA-I and of native GBS CPSs by MAL-I validated that sialic acid forms α -2,6 and α -2,3 links, respectively, with the adjacent galactose (Fig. 2B and C). In the case of desialylated *S. suis* type 14 CPS, a positive reaction was observed with both SNA-I and MAL-I. Similarly, a positive reaction was observed for desialylated GBS type III CPS with MAL-I (Fig. 2B and C). Because negative reactions with LFA and NMR analysis (Fig. 2A; see Supplemental Fig. 1 and 2 in the supplemental material) clearly demonstrated the absence of sialic acid in these desialylated preparations, the positive reaction with SNA-I can be explained by the nonspecific binding of the lectin to d-galactose (37). Recognition of the Gal β -1,4-GlcNAc epitope of desialylated *S. suis* type 14 and GBS type III CPSs by MAL-I can explain the unspecific reaction of this lectin with these two preparations (51).

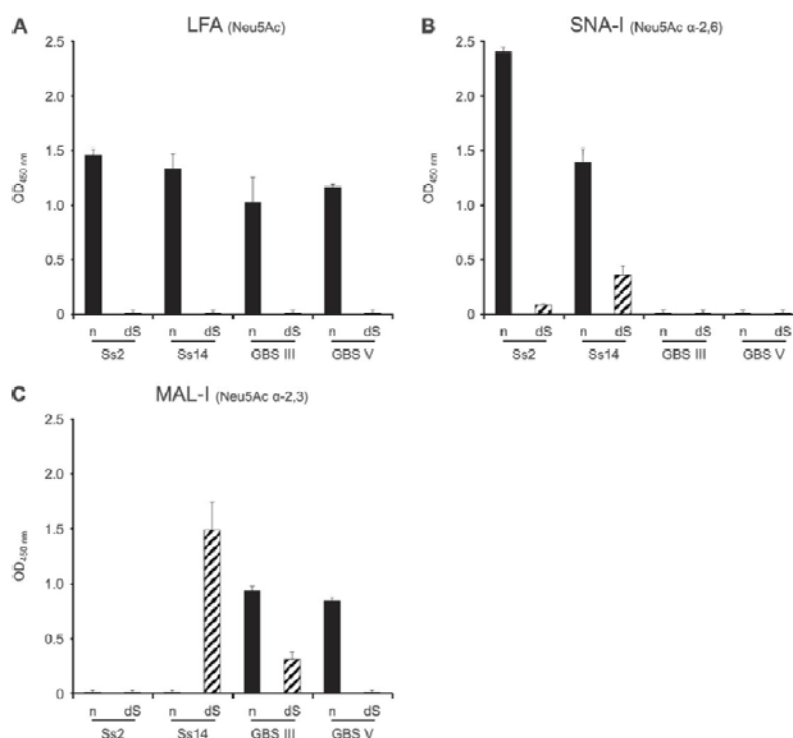


Fig. 2. Recognition of *S. suis* and GBS CPSs by ELLA.

Native (n) or desialylated (dS) *S. suis* type 2 (Ss2), *S. suis* type 14 (Ss14), GBS type III, or GBS type V CPS (each at 2 μ g/ml) was incubated with *Limax flavus* agglutinin specific for Neu5Ac (LFA) (A), Sambucus nigra agglutinin specific for Neu5Ac α -2,6 links (SNA-I) (B), or Maackia amurensis leucoagglutinin specific for Neu5Ac α -2,3 links (MAL-I) (C). Data are expressed as mean OD₄₅₀ with SEM for at least three experiments with at least three technical replicates and are corrected for reaction of the dilution buffer with the corresponding lectin.

S. suis and GBS CPSs induce the release of chemokines by DCs

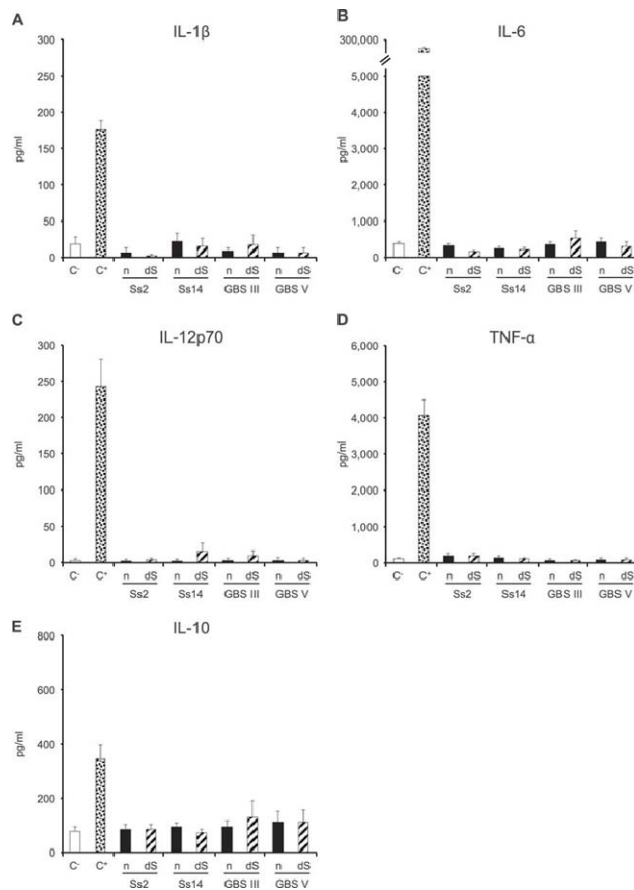


Fig. 3. Pro- and anti-inflammatory cytokine production by DCs in response to stimulation by *S. suis* or GBS CPSs for 24 h.

Native (n) or desialylated (dS) *S. suis* type 2 (Ss2), *S. suis* type 14 (Ss14), GBS type III, or GBS type V CPS (each at 200 μ g/ml) was incubated with DCs (10^6 cells/ml). After 24 h, supernatants were collected, and IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-12p70 (C), TNF- α (D), and IL-10 (E) levels were quantified by ELISA. Cells stimulated with medium alone and with LPS (1 μ g/ml) served as negative (C⁻) and positive (C⁺) controls, respectively. Data are expressed as means with SEM (pg/ml) for at least three experiments with at least three technical replicates.

The levels of several cytokines and chemokines in the supernatants of DCs incubated with *S. suis* type 2 or 14 or GBS type III or V CPS (each at 200 μ g/ml) were measured 24 h after stimulation. No significant difference in pro- or anti-inflammatory cytokine production was observed between DCs incubated with the different CPSs and those incubated with medium alone (Fig. 3). Similar results were obtained 6 h after stimulation (data not shown). The presence of sialic acid did not influence the release of these cytokines, as no significant difference was observed between native and desialylated CPSs (Fig. 3).

In contrast, *S. suis* and GBS CPSs induced significant release of the chemokines CCL2 and CCL3 at 24 h (Fig. 4). CCL3 production was induced similarly by all CPS preparations (Fig. 4A). On the other hand, CCL2 production was significantly higher when DCs were activated with *S. suis* CPSs ($P < 0.001$) (Fig. 4B). In the case of *S. suis*, more CCL2 production was observed for DCs stimulated with *S. suis* type 14 CPS than for those

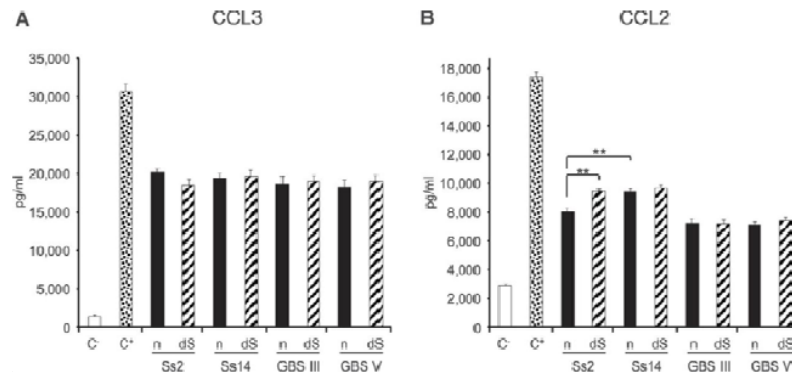


Fig. 4. Chemokine production by DCs in response to stimulation by *S. suis* or GBS CPSs for 24 h.

Native (n) or desialylated (dS) *S. suis* type 2 (Ss2), *S. suis* type 14 (Ss14), GBS type III, or GBS type V CPS (each at 200 µg/ml) was incubated with DCs (10^6 cells/ml). After 24 h, supernatants were collected, and CCL3 (A) and CCL2 (B) levels were quantified by ELISA. Cells stimulated with medium alone and with LPS (1 µg/ml) served as negative (C⁻) and positive (C⁺) controls, respectively. Data are expressed as means with SEM (pg/ml) for at least three experiments with at least three technical replicates. ** $P < 0.001$.

stimulated with *S. suis* type 2 CPS ($P < 0.001$). Sialic acid plays a partial inhibitory role in the production of CCL2 for *S. suis* type 2 CPS only ($P < 0.001$). To explore more precisely the characteristics of CCL2 and CCL3 production, dose- and time-response analyses were performed. CCL2 release induced by *S. suis* type 2 CPS was shown to be directly proportional to the CPS concentration and the time of incubation, with maximum release obtained at 24 h with a concentration of 200 µg/ml CPS (Fig. 5). Similar results were obtained with *S. suis* type 14 and GBS type III and V CPSs, for both CCL2 and CCL3 production (data not shown).

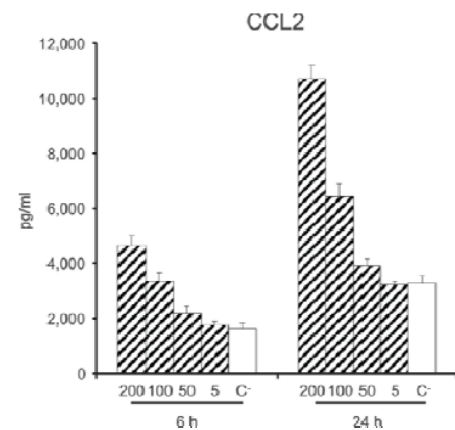


Fig. 5. CCL2 production by DCs in response to stimulation by *S. suis* type 2 CPS is dose and time dependent.

Native *S. suis* type 2 CPS (200, 100, 50, or 5 µg/ml) was incubated with DCs (10^6 cells/ml). After 6 or 24 h, supernatants were collected and CCL2 levels were quantified by ELISA. Cells stimulated with medium alone served as a negative control (C⁻). Data are expressed as means with SEM (pg/ml) for at least three experiments with at least three technical replicates.

Involvement of PRRs in chemokine release by DCs stimulated with S. suis and GBS CPSs

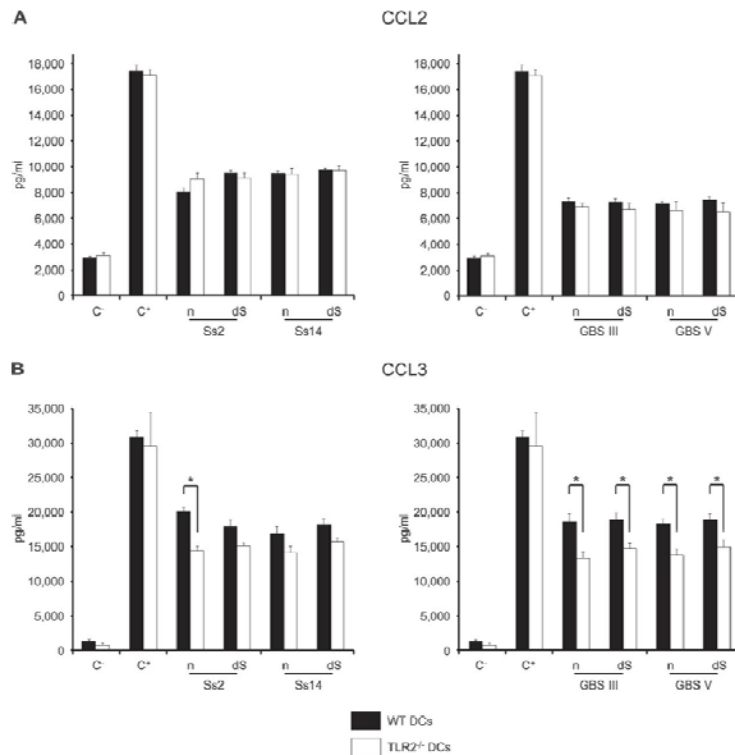


Fig. 6. Role of TLR2 in chemokine production by DCs in response to stimulation by *S. suis* or GBS CPSs for 24 h.

Native (n) or desialylated (dS) *S. suis* type 2 (Ss2), *S. suis* type 14 (Ss14), GBS type III, or GBS type V CPS (each at 200 µg/ml) was incubated with WT (black bars) or TLR2^{-/-} (white bars) DCs (10⁶ cells/ml). After 24 h, supernatants were collected and CCL2 (**A**) and CCL3 (**B**) levels were quantified by ELISA. Cells stimulated with medium alone and with LPS (1 µg/ml) served as negative (C⁻) and positive (C⁺) controls, respectively. Data are expressed as means with SEM (pg/ml) for at least three experiments with at least three technical replicates. *, *P* < 0.05.

Previous *in vitro* studies have demonstrated that well-encapsulated *S. suis* type 2 induces TLR2 mRNA expression by human monocytes (52) and porcine DCs (15) and stimulates cytokine and chemokine production by murine macrophages and DCs in a TLR2- and MyD88-dependent manner (52, 53). Moreover, the release of cytokines by *S. suis*-stimulated human monocytes was significantly reduced by Ab-mediated blocking of TLR2 but not TLR4 (52). In the case of GBS type III, the killed bacterium induces TLR2 mRNA expression and TLR2-dependent expression of certain cytokines and chemokines by murine macrophages (54). Killed GBS type III stimulates TNF-α release by those cells, in a TLR2-independent but MyD88-dependent way (55). As earlier studies have shown that PRRs such as TLRs are involved in cytokine production by APCs stimulated with purified CPSs from several different bacteria (25, 27, 56), we aimed to evaluate the implication of these receptors in the production of chemokines by DCs activated with our CPSs. Therefore, levels of CCL2 and CCL3 release were compared between WT and TLR2^{-/-} or MyD88^{-/-} DCs incubated with *S. suis* or GBS CPSs (at 200 µg/ml) for 24 h. As shown in

Fig. 6A and 7A, no significant difference in CCL2 production was observed between WT and TLR2^{-/-} DCs or between WT and MyD88^{-/-} DCs for either *S. suis* or GBS CPSs. On the other hand, TLR2^{-/-} DCs activated with either GBS type III or type V CPS showed a partial reduction of CCL3 production compared to their WT DC counterparts ($P < 0.05$). In the case of *S. suis*, a significant effect of TLR2 on CCL3 production was observed only for native *S. suis* type 2 CPS, indicating the involvement of other receptors (Fig. 6B). Indeed, a significant impairment of CCL3 production by MyD88^{-/-} DCs incubated with all four *S. suis* or GBS CPSs was observed, with decreases varying between 40 and 50% ($P < 0.001$) (Fig. 7B). In general, the presence of sialic acid did not seem to significantly modulate the interactions between either GBS or *S. suis* CPSs and the TLR/MyD88 pathway (Fig. 6 and 7).

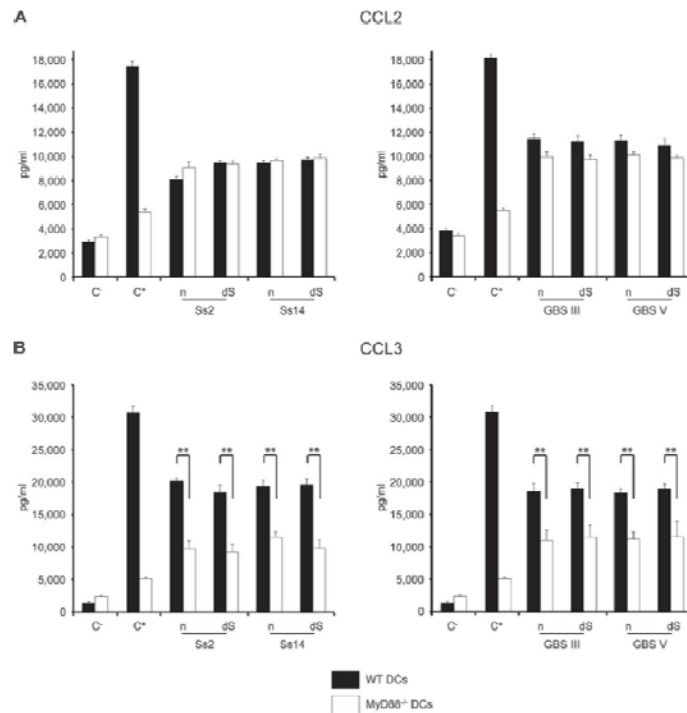


Fig. 7. Role of MyD88 in chemokine production by DCs in response to stimulation by *S. suis* or GBS CPSs for 24 h.

Native (n) or desialylated (dS) *S. suis* type 2 (Ss2), *S. suis* type 14 (Ss14), GBS type III, or GBS type V CPS (each at 200 µg/ml) was incubated with WT (black bars) or MyD88^{-/-} DCs (10⁶ cells/ml). After 24 h, supernatants were collected and CCL2 (A) and CCL3 (B) levels were quantified by ELISA. Cells stimulated with medium alone and with LPS (1 µg/ml) served as negative (C⁻) and positive (C⁺) controls, respectively. Data are expressed as means with SEM (pg/ml) for at least three experiments with at least three technical replicates. ** $P < 0.001$.

Modulation of BAFF gene expression by DCs incubated with S. suis and GBS CPSs

In contrast to the numerous studies that have focused on the effects of BAFF on B cell physiology, there is a relative paucity of evidence concerning BAFF production by DCs. A recent study has shown that the prototype TI antigen NP-Ficoll is able to induce the release of BAFF by murine DCs, which is essential for the development of Ab responses (57). To analyze whether *S. suis* and GBS CPSs modulate BAFF mRNA expression levels, DCs were stimulated with native CPSs at 6 and 24 h. IFN- γ (10 ng/ml), which is known to stimulate BAFF synthesis by monocytes, macrophages, and DCs (29, 58, 59), was used as a positive control. As shown in Fig. 8, no significant difference in BAFF expression levels was observed between CPS-activated DCs and control nonstimulated cells at either 6 or 24 h. Only a slight upregulation (<2-fold increase) of BAFF mRNA expression was observed at 6 h for all native CPS preparations. As sialic acid has been shown to inhibit B cell activation (60), we wanted to know if this sugar could be involved in the inhibition of BAFF expression as well. Sialic acid did not significantly modulate BAFF expression by DCs (Fig. 8).

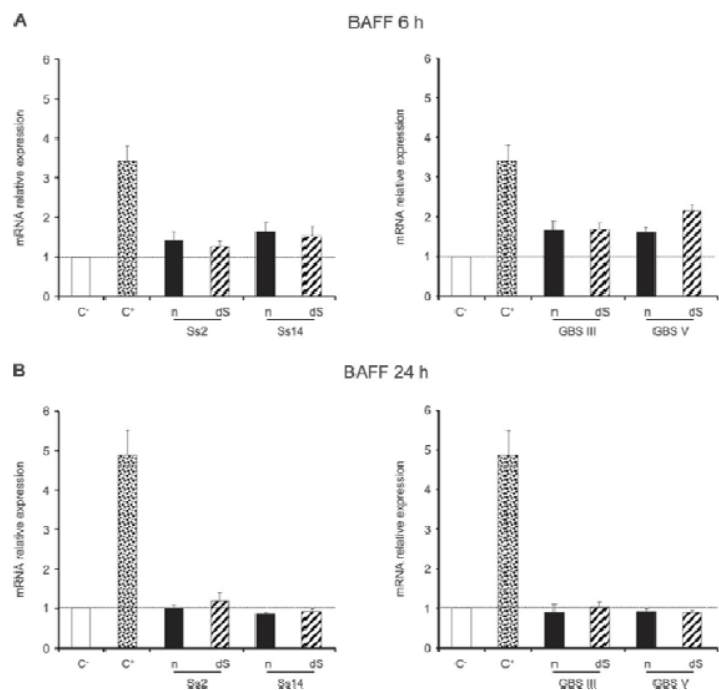
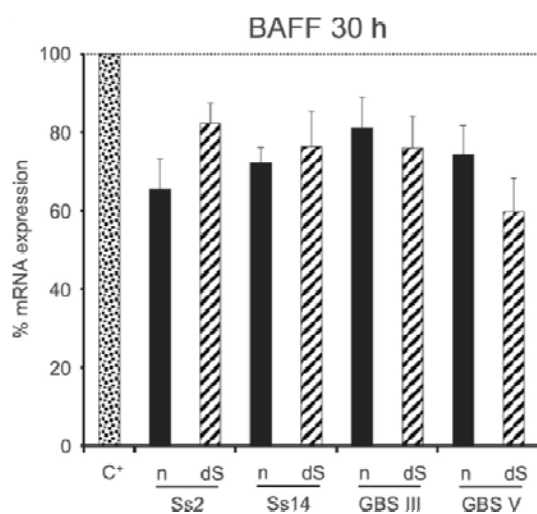


Fig. 8. Relative expression of BAFF mRNA by DCs in response to stimulation by *S. suis* or GBS CPSs for 24 h.

Native (n) or desialylated (dS) *S. suis* type 2 (Ss2), *S. suis* type 14 (Ss14), GBS type III, or GBS type V CPS (each at 200 μ g/ml) was incubated with DCs (10^6 cells/ml). After 6 h (A) or 24 h (B) of incubation, cells were collected and BAFF mRNA expression was determined by RT-qPCR. Cells stimulated with IFN- γ (10 ng/ml) served as a positive control (C⁺). Data are expressed as means with SEM for at least three experiments and are relative to the level for DCs stimulated with medium alone (C⁻), which was arbitrarily fixed to 1.

To further evaluate the capacity of GBS and *S. suis* CPSs to inhibit BAFF expression by DCs, we evaluated the impact of DC preincubation with CPS on IFN- γ -



induced BAFF. To this end, DCs were precultured with the different CPSs for 6 h prior to stimulation with IFN- γ for 24 h. Diminutions of BAFF mRNA expression ranging from 20 to 40% were observed when DCs were preincubated with either *S. suis* or GBS CPSs in comparison with nonpretreated cells, confirming the inhibitory effect of these bacterial CPSs on BAFF expression (Fig. 9).

Fig. 9. Effect of pre-incubation of DCs with *S. suis* or GBS CPSs on IFN- γ -induced expression of BAFF mRNA.

DCs (10^6 cells/ml) were prestimulated with native (n) or desialylated (dS) *S. suis* type 2 (Ss2), *S. suis* type 14 (Ss14), GBS type III, or GBS type V CPS (each at 200 μ g/ml) for 6 h prior to incubation with IFN- γ (10 ng/ml) for 24 h. Cells were then collected, and BAFF mRNA expression was determined by RT-qPCR. Cells prestimulated with medium alone before addition of IFN- γ served as a positive control (C⁺). Data are expressed as means with SEM for at least three experiments and are relative to the C⁺ level, which was arbitrarily fixed to 100%.

Discussion

CPS is a crucial component for both *S. suis* and GBS. In addition to forming the basis for serotype designation and being the major virulence factor, it has, as an immunogen, a high protective potential in the fight against infections by these two streptococci. Indeed, as shown with other encapsulated bacteria, such as *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, and *Haemophilus influenzae*, the specific anti-CPS humoral response could play a decisive role in host survival of *S. suis* or GBS infections. Previous studies have demonstrated that mouse or pig anti-*S. suis* type 2 CPS Abs have a protective role in homologous opsonophagocytosis *in vitro* assays (40, 61, 62) or during *in vivo* challenge (40, 63). Finally, Abs raised against several GBS CPS serotypes, including

serotypes Ia, Ib, II, III, and V, are protective against neonatal infections in both animals and humans and exhibit opsonophagocytosis ability *in vitro* (64).

However, *S. suis* and GBS CPSs are poorly immunogenic molecules because they cannot recruit T cell help for B cell functions. Mothers of neonates developing GBS type III disease have low concentrations of anti-CPS Abs in sera at delivery (65), and very few anti-CPS Abs can be detected in pigs infected with *S. suis* type 2 (61, 63). To counter the low immunogenicity of CPSs, researchers have developed a conjugate vaccine composed of CPS linked to a carrier protein, as is the case for GBS. However, the efficacy of in-trial GBS conjugate vaccines depends on the CPS serotype included in the preparation. Indeed, CPSs of types Ia, Ib, II, and III induce strong protective IgG responses, whereas GBS type V CPS promotes higher concentrations of specific IgM than IgG (64). This suggests that the composition and/or structure of CPS could influence its immunogenicity. Certain structural features of CPSs, such as variations in repeating unit composition or glycosidic linkage positions, are susceptible to producing different immune responses (66-68).

Despite these observations, very few studies have been dedicated to the characterization of CPS activity on APCs and to the corresponding signaling mechanisms. Some bacterial CPS motifs, including sialic acid, are very similar to molecules expressed by human cells or tissues, which could result in immune evasion through molecular mimicry (68). Therefore, chemical alteration of sialic acid of *N. meningitidis* type B CPS by de-N-acetylation or deletion of this sugar in GBS type V CPS improved the immunogenicity of these two CPSs (49, 69). However, the consequences of capsular sialic acid manipulation on the capacity of CPS to activate the immune system have been evaluated only in the context of Ab production. The mechanisms underlying this effect, such as the modulation of the function of APCs, are poorly known.

In this article, we analyzed the ability of *S. suis* and GBS CPSs to activate DCs as determined by production of cytokines and chemokines susceptible to being involved in TI responses. Mouse-origin DCs were used because mouse models are well described for both pathogens and because *in vitro* interactions of GBS or *S. suis* with mouse-, human-, and/or swine-origin cells show similar results (12, 14, 15, 52, 53, 70, 71). We used native and desialylated CPSs isolated from two of the most virulent and frequently isolated serotypes in humans for each bacterial species in order to examine the role of CPS

composition in modulation of DC activation. The capsular preparations underwent a series of rigorous physicochemical and immunologic quality control tests, which attested the high purity of the CPSs, the preservation of epitope recognition, and the absence of sialic acid in the desialylated preparations. Our results demonstrated that native *S. suis* type 2 and 14 and GBS type III and V CPSs do not induce the release of key proinflammatory cytokines, which confirms the poor immunogenic nature of these molecules. This is in accordance with previous experiments where *S. suis* type 2 CPS did not induce the production of either IL-1 β , IL-6, or TNF- α by human monocytes or murine macrophages (52, 72). However, our results are in contradiction with earlier studies which showed that GBS type III CPS stimulated the production of TNF- α and IL-6 by human cord blood monocytes (73, 74). This difference could be explained by the use of different cells or by variations in the purification method. Nevertheless, the authors of those studies indicated that GBS type III CPS was a poor stimulator compared to other bacterial cell wall components (73, 74). Other studies using CPSs purified from other bacterial species have concluded likewise, that such a molecule is a poor activator of the immune system. *S. pneumoniae* CPS incubated with human monocyte-derived DCs produced no or very small amounts of IL-12 or IL-10 (75). Similarly, *N. meningitidis* type C CPS was unable to induce production of IL-6 and TNF- α by human monocytes or macrophages (76). By using desialylated CPSs, we demonstrated for the first time that sialic acid does not seem to play an inhibitory role in the release of proinflammatory cytokines by DCs. The presence of sialic acid has been linked to production of the regulatory cytokine IL-10 (77, 78). However, sialic acid in either GBS CPSs or *S. suis* CPSs did not result in increased IL-10 production by DCs. Thus, an imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokine profiles cannot explain the poorly DC-stimulatory properties of either GBS or *S. suis* CPSs.

Interestingly, *S. suis* and GBS CPSs remarkably stimulated DC production of two members of the CC family of chemokines, i.e., CCL2 and CCL3. These two chemokines are known to play a major role in the selective recruitment of monocytes, macrophages, DCs, and lymphocytes to sites of inflammation (79, 80). A high level of CCL2 in the central nervous system is a characteristic of patients with bacterial meningitis (81). Systemic production of this chemokine, as well as its expression in the brain, is a feature of *S. suis* type 2-infected mice (82), and CCL2 has been associated with clinical signs of GBS sepsis in neonates (83). Recently, whole *S. suis* type 2 was shown to induce CCL2 production by murine DCs (12) and CCL3 production by total mouse splenocytes (unpublished data).

Similarly, studies have shown that whole GBS type III stimulates CCL2 and CCL3 secretion by murine macrophages and/or DCs (84, 85). Our observations with purified CPSs allow a better interpretation of previous data showing different patterns of chemokine production obtained with total leukocytes, monocytes, and/or DCs cultured in the presence of whole *S. suis* type 2 or GBS types III and V and their respective non-encapsulated mutants. Indeed, in these studies, production of CCL2 and/or CCL3 was significantly diminished with bacteria lacking CPS (52, 71, 85), suggesting an important role of CPS in contributing to the production of these chemokines. Our observations are analogous to those of antecedent studies where *S. suis* type 2 CPS was able to induce the expression of CCL2 mRNA in a porcine whole-blood culture system and the release of this chemokine by human monocytes and murine macrophages (52, 71). Other studies have reported that purified CPSs from *N. meningitidis*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides fragilis* stimulate liberation of chemokines by murine macrophages or DCs (26-28). Surprisingly, differences in composition or structure between *S. suis* and GBS CPSs or the presence of sialic acid did not deeply influence the release of chemokine by DCs.

It is well known that PRRs, including TLRs, are involved in the activation of immune cells by encapsulated bacteria and/or their purified CPSs (27, 56, 86). Our results indicate that the production of CCL2 by native or desialylated *S. suis* or GBS CPSs is independent of TLR2- or MyD88-related pathways. Similarly, production of CCL2 by murine macrophages incubated with *S. suis* type 2 CPS has previously been shown to be TLR2 and MyD88 independent (52). Macrophage expression of CCL2 induced by whole GBS type III has also been reported to be TLR2 independent (54).

While CCL2 and CCL3 are two members of the CC family of chemokines presenting similarities in the regulation of their synthesis as well as in their biological functions, CCL3 production induced by *S. suis* or GBS CPSs was significantly diminished with MyD88^{-/-} DCs and partially affected with TLR2^{-/-} DCs. Interestingly, and in contrast to the case for CCL2, macrophage expression of CCL3 induced by whole GBS type III has been reported to be TLR2 dependent (54). While differential expression of these two chemokines has been reported in other systems (87), the underlying regulatory mechanisms are unknown. Nevertheless, the partial inhibition of CCL3 production in TLR2^{-/-} or MyD88^{-/-} DCs suggests that other TLRs as well as MyD88-independent pathways may be implicated in chemokine release by *S. suis* or GBS CPSs. The concept of direct interaction of CPSs with TLRs is still

controversial. Although we used highly purified CPS material undergoing strict quality controls, the possibility of undetected contamination by traces of lipoproteins cannot be excluded. Cells deficient in TLR2 might also fail to express adequate levels of a receptor that may be relevant for CPS recognition. Members of the large family of lectin receptors are other possible receptor candidates (77, 88) and warrant further investigations.

CPS antigens, with few exceptions, are considered TI antigens. It is well known that the TNF family member BAFF plays a crucial role in the immune response against these antigens. Whereas several studies have shown that the TLR ligand LPS or the prototype TI antigen NP-Ficoll stimulates expression or production of BAFF by total splenocytes, macrophages, or DCs (29, 57, 59, 89), there is a relative paucity of evidence concerning BAFF induction by CPSs. In our study, we observed that *S. suis* and GBS CPSs were unable to induce a significant expression of BAFF by DCs in comparison with that in unstimulated cells. This is in accordance with a previous study where *N. meningitidis* type C and GBS type V CPSs did not promote the release of BAFF by murine DCs (57), and it confirms the poor immunogenicity of CPSs. We observed that CPSs presented a suppressive effect on the capacity of IFN- γ to induce BAFF expression, and some CPSs were able to provoke an inhibition of up to 40%. Similarly, *N. meningitidis* type C and GBS type V CPSs have been shown to inhibit intracellular and extracellular levels of IFN- γ -induced BAFF in murine DCs (57). We evaluated for the first time the influence of sialic acid on this effect. However, sialylation did not play a major role in modulation of BAFF expression. The negative regulatory function of CPSs is not observed only on BAFF mRNA synthesis. The presence of CPS impairs cytokine release by DCs and macrophages activated by *S. suis* (12, 15, 52, 70). The inhibitory effect of CPS is not specific to cytokine expression but affects other cell functions, such as the expression of costimulatory molecules and major histocompatibility complex class II by DCs (15). *S. suis* type 2 CPS has been shown to downmodulate phagocytosis by destabilizing lipid microdomains and inhibiting activation of signaling pathways involved in phagocytosis (90, 91), whereas GBS type III CPS impairs bactericidal functions of neutrophils (77).

In conclusion, we found that highly purified CPSs isolated from two distinct serotypes of two different Gram-positive streptococci, *S. suis* and GBS, were principally poorly immunogenic antigens. However, they were able to specifically induce production of CCL2 and CCL3 by DCs. TLR2 and other MyD88-dependent pathways are partially

involved in recognition of these CPSs, which might also implicate a more complex cross talk with other receptors. Interestingly, the effect of CPS composition (including sialic acid) and structure on DC function was less marked than that previously reported for B cell activation (67, 68) or than the observed variations in CPS recognition by specific sera in our dot-ELISA analysis. Thus, DCs seem to recognize and respond to these CPSs in a “patterned” way rather than a structure-dictated manner, which is in agreement with the role of the innate immune system. Further studies on the impact of DC activation status on B cell responses to these TI antigens are guaranteed.

Acknowledgement

This work was supported mainly by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through a grant to M.S. (grant 342150-07) and in part by a Canadian Institutes of Health Research grant and by the Fonds de Recherche du Québec–Nature et Technologies (FRQNT)–New Initiatives program to M.S. and M.-R.V.C.

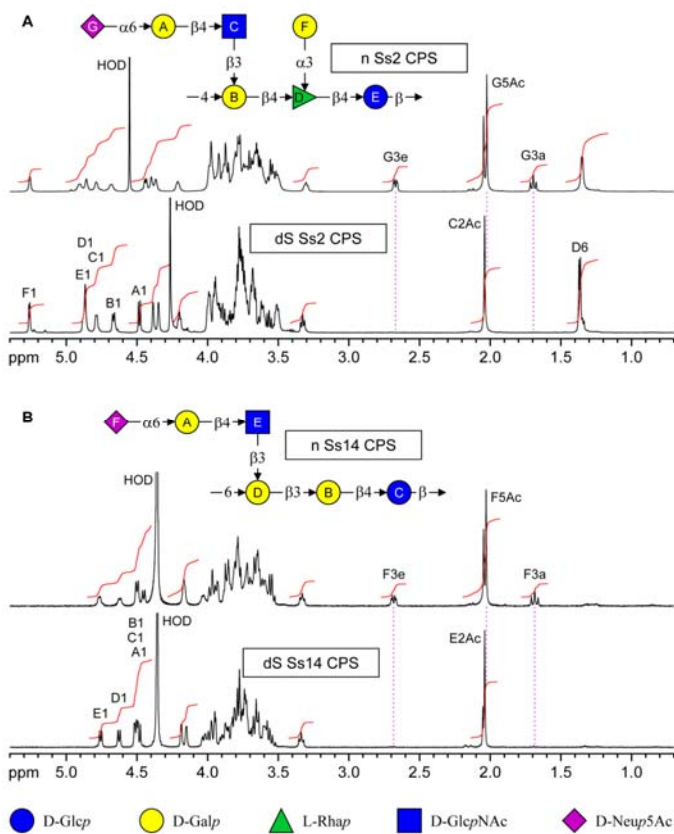
SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental Table I. Sequences of murine-specific real-time PCR primers.

Name	Accession number	Forward	Reverse
BAFF	NM_033622	TGACCCTGTTCCGATGTATTC	TCCAGCAAGTGAGTTACAGC
ATP5B	NM_016774	ACCAGCCCACCCTAGCCACC	TGCAGGGGCAGGGTCAGTCA
CYC1	NM_025567	CGTATTTTCCCTGCTCACTG	GCGACATCCTTAGCTACTTG

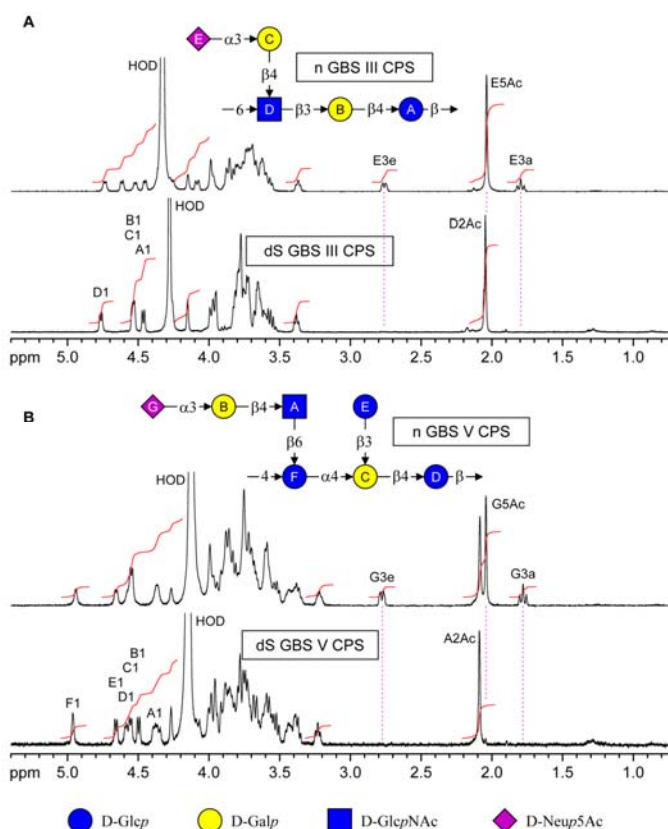
^a Oligonucleotide primers were from Integrated DNA Technologies.

SUPPLEMENTAL FIGURES



Supplemental Fig. 1. Nuclear magnetic resonance spectra of native and desialylated *S. suis* capsular polysaccharides.

600-MHz ¹H NMR spectra of native *S. suis* 2 (n Ss2) CPS in 33 mM phosphate buffer p2H 8.0 in 2H₂O at 50°C (top) and desialylated *S. suis* 2 (dS Ss2) CPS in 2H₂O at 75°C (bottom) (A). 500-MHz ¹H NMR spectra of native *S. suis* 14 (n Ss14) CPS in 33 mM phosphate buffer p2H 8.0 in 2H₂O (top) and desialylated *S. suis* 14 (dS Ss14) CPS in 2H₂O (bottom) at 60°C (B).



Supplemental Fig. 2. Nuclear magnetic resonance spectra of native and desialylated GBS capsular polysaccharides.

500-MHz ^1H NMR spectra of native (n) GBS III CPS at 60°C (top) and desialylated (dS) GBS III CPS at 70°C (bottom) in $2\text{H}_2\text{O}$ (A). 500-MHz ^1H NMR spectra of native (n) GBS V CPS (top) and desialylated (dS) GBS V CPS (bottom) in $2\text{H}_2\text{O}$ at 80°C (B).

References

1. **Edwards MS, Baker CJ.** 2005. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* **41**:839-847.
2. **Koenig JM, Keenan WJ.** 2009. Group B *Streptococcus* and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr Clin North Am* **56**:689-708.
3. **Blumberg HM, Stephens DS, Modansky M, Erwin M, Elliot J, et al.** 1996. Invasive Group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. *J Infect Dis* **173**:365-373.
4. **Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M.** 2010. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol* **5**:371-391.
5. **Segura M.** 2009. *Streptococcus suis*: an emerging human threat. *J Infect Dis* **199**:4-6.

6. **Gottschalk M, Segura M, Xu J.** 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim Health Res Rev* **8**:29-45.
7. **Kerdsin A, Oishi K, Sripakdee S, Boonkerd N, Polwichai P, et al.** 2009. Clonal dissemination of human isolates of *Streptococcus suis* serotype 14 in Thailand. *J Med Microbiol* **58**:1508-1513.
8. **Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, et al.** 2005. Structural and genetic diversity of Group B *Streptococcus* capsular polysaccharides. *Infect Immun* **73**:3096-3103.
9. **Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M.** 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol* **7**:259-279.
10. **Van Calsteren MR, Gagnon F, Lacouture S, Fittipaldi N, Gottschalk M.** 2010. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide. *Biochem Cell Biol* **88**:513-525.
11. **Van Calsteren MR, Gagnon F, Calzas C, Goyette-Desjardins G, Okura M, et al.** 2013. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 14 capsular polysaccharide. *Biochem Cell Biol* **91**:49-58.
12. **Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, et al.** 2011. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis* **204**:919-929.
13. **Lemire P, Houde M, Lecours MP, Fittipaldi N, Segura M.** 2012. Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells. *Microbes Infect* **14**:1064-1076.
14. **Segura MA, Cleroux P, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* and Group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**:189-195.
15. **Lecours MP, Segura M, Lachance C, Mussa T, Surprenant C, et al.** 2011. Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. *Vet Res* **42**:72.
16. **Takahashi S, Aoyagi Y, Adderson EE, Okuwaki Y, Bohnsack JF.** 1999. Capsular sialic acid limits C5a production on type III Group B streptococci. *Infect Immun* **67**:1866-1870.
17. **Crocker PR, Paulson JC, Varki A.** 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* **7**:255-266.
18. **Chaffin DO, Mentele LM, Rubens CE.** 2005. Sialylation of Group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression. *J Bacteriol* **187**:4615-4626.
19. **Lecours MP, Fittipaldi N, Takamatsu D, Okura M, Segura M, et al.** 2012. Sialylation of *Streptococcus suis* serotype 2 is essential for capsule expression but is not responsible for the main capsular epitope. *Microbes Infect* **14**:941-950.
20. **Takeuchi O, Akira S.** 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**:805-820.
21. **Steinman RM.** 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**:271-296.
22. **Mond JJ, Vos Q, Lees A, Snapper CM.** 1995. T cell independent antigens. *Curr Opin Immunol* **7**:349-354.
23. **Weintraub A.** 2003. Immunology of bacterial polysaccharide antigens. *Carbohydr Res* **338**:2539-2547.

24. **Simpson SQ, Singh R, Bice DE.** 1994. Heat-killed pneumococci and pneumococcal capsular polysaccharides stimulate tumor necrosis factor- α production by murine macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**:284-289.
25. **Wang Q, McLoughlin RM, Cobb BA, Charrel-Dennis M, Zaleski KJ, et al.** 2006. A bacterial carbohydrate links innate and adaptive responses through Toll-like receptor 2. *J Exp Med* **203**:2853-2863.
26. **d'Empaire G, Baer MT, Gibson FC, 3rd.** 2006. The K1 serotype capsular polysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* elicits chemokine production from murine macrophages that facilitates cell migration. *Infect Immun* **74**:6236-6243.
27. **Zughaier SM.** 2011. *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharides induce inflammatory responses via TLR2 and TLR4-MD-2. *J Leukoc Biol* **89**:469-480.
28. **Soell M, Diab M, Haan-Archipoff G, Beretz A, Herbelin C, et al.** 1995. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. *Infect Immun* **63**:1380-1386.
29. **Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, et al.** 2002. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol* **3**:822-829.
30. **Craxton A, Magaletti D, Ryan EJ, Clark EA.** 2003. Macrophage- and dendritic cell-dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF. *Blood* **101**:4464-4471.
31. **Jacques M, Gottschalk M, Foiry B, Higgins R.** 1990. Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* **172**:2833-2838.
32. **Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR, Henrichsen J.** 1989. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* **27**:2633-2636.
33. **Kuypers JM, Heggen LM, Rubens CE.** 1989. Molecular analysis of a region of the Group B *Streptococcus* chromosome involved in type III capsule expression. *Infect Immun* **57**:3058-3065.
34. **Michon F, Blake M.** 2001. Procedures for the extraction and isolation of bacterial capsular polysaccharides for use as vaccines or linked to proteins as conjugate vaccines.
35. **Brandrup J, Immergut EH, Grulke EA.** 2005. Polymer handbook 4th ed. John Wiley & Sons, New York, NY.
36. **Gornik O, Lauc G.** 2007. Enzyme linked lectin assay (ELLA) for direct analysis of transferrin sialylation in serum samples. *Clin Biochem* **40**:718-723.
37. **Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, et al.** 1987. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem* **262**:1596-1601.
38. **Geisler C, Jarvis DL.** 2011. Effective glycoanalysis with *Maackia amurensis* lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology* **21**:988-993.
39. **Miller RL, Collawn JF, Jr., Fish WW.** 1982. Purification and macromolecular properties of a sialic acid-specific lectin from the slug *Limax flavus*. *J Biol Chem* **257**:7574-7580.
40. **Charland N, Jacques M, Lacouture S, Gottschalk M.** 1997. Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2. *Microbiology* **143** (Pt 11):3607-3614.
41. **Higgins R, Gottschalk M.** 1990. An update on *Streptococcus suis* identification. *J Vet Diagn Invest* **2**:249-252.

42. **Segura M, Su Z, Piccirillo C, Stevenson MM.** 2007. Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression. *Eur J Immunol* **37**:1887-1904.
43. **van den Berg TK, Kraal G.** 2005. A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. *Trends Immunol* **26**:506-509.
44. **MacDonald AS, Straw AD, Bauman B, Pearce EJ.** 2001. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. *J Immunol* **167**:1982-1988.
45. **Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, et al.** 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* **223**:77-92.
46. **Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-408.
47. **Deng L, Kasper DL, Krick TP, Wessels MR.** 2000. Characterization of the linkage between the type III capsular polysaccharide and the bacterial cell wall of Group B *Streptococcus*. *J Biol Chem* **275**:7497-7504.
48. **Gonzalez-Outeirino J, Kadirvelraj R, Woods RJ.** 2005. Structural elucidation of type III Group B *Streptococcus* capsular polysaccharide using molecular dynamics simulations: the role of sialic acid. *Carbohydr Res* **340**:1007-1018.
49. **Guttormsen HK, Paoletti LC, Mansfield KG, Jachymek W, Jennings HJ, et al.** 2008. Rational chemical design of the carbohydrate in a glycoconjugate vaccine enhances IgM-to-IgG switching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:5903-5908.
50. **Jennings HJ, Lugowski C, Kasper DL.** 1981. Conformational aspects critical to the immunospecificity of the type III Group B streptococcal polysaccharide. *Biochemistry* **20**:4511-4518.
51. **Knibbs RN, Goldstein IJ, Ratcliffe RM, Shibuya N.** 1991. Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leukoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*. Comparison with other sialic acid-specific lectins. *J Biol Chem* **266**:83-88.
52. **Graveline R, Segura M, Radzioch D, Gottschalk M.** 2007. TLR2-dependent recognition of *Streptococcus suis* is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness. *Int Immunol* **19**:375-389.
53. **Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M.** 2012. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS One* **7**:e44746.
54. **Draper DW, Bethea HN, He YW.** 2006. Toll-like receptor 2-dependent and -independent activation of macrophages by Group B streptococci. *Immunol Lett* **102**:202-214.
55. **Henneke P, Takeuchi O, van Strijp JA, Guttormsen HK, Smith JA, et al.** 2001. Novel engagement of CD14 and multiple toll-like receptors by Group B streptococci. *J Immunol* **167**:7069-7076.
56. **Um SH, Rhee DK, Pyo S.** 2002. Involvement of protein kinase C and tyrosin kinase in tumoricidal activation of macrophage induced by *Streptococcus pneumoniae* type II capsular polysaccharide. *Int Immunopharmacol* **2**:129-137.
57. **Kanswal S, Katsenelson N, Allman W, Uslu K, Blake MS, et al.** 2011. Suppressive effect of bacterial polysaccharides on BAFF system is responsible for their poor immunogenicity. *J Immunol* **186**:2430-2443.

58. **Kim HA, Jeon SH, Seo GY, Park JB, Kim PH.** 2008. TGF-beta1 and IFN-gamma stimulate mouse macrophages to express BAFF via different signaling pathways. *J Leukoc Biol* **83**:1431-1439.
59. **Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, et al.** 2001. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood* **97**:198-204.
60. **Courtney AH, Puffer EB, Pontrello JK, Yang ZQ, Kiessling LL.** 2009. Sialylated multivalent antigens engage CD22 in trans and inhibit B cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:2500-2505.
61. **Elliott SD, Clifton-Hadley F, Tai J.** 1980. Streptococcal infection in young pigs. V. An immunogenic polysaccharide from *Streptococcus suis* type 2 with particular reference to vaccination against streptococcal meningitis in pigs. *J Hyg (Lond)* **85**:275-285.
62. **Baums CG, Kock C, Beineke A, Bennecke K, Goethe R, et al.** 2009. *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. *Clin Vaccine Immunol* **16**:200-208.
63. **del Campo Sepulveda EM, Altman E, Kobisch M, D'Allaire S, Gottschalk M.** 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. *Vet Microbiol* **52**:113-125.
64. **Heath PT.** 2011. An update on vaccination against Group B *Streptococcus*. *Expert Rev Vaccines* **10**:685-694.
65. **Baker CJ, Kasper DL.** 1976. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal Group B streptococcal infection. *N Engl J Med* **294**:753-756.
66. **Avci FY, Kasper DL.** 2010. How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system. *Annu Rev Immunol* **28**:107-130.
67. **Wessels MR, Paoletti LC, Rodewald AK, Michon F, DiFabio J, et al.** 1993. Stimulation of protective antibodies against type Ia and Ib Group B streptococci by a type Ia polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *Infect Immun* **61**:4760-4766.
68. **Finne J, Leinonen M, Makela PH.** 1983. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* **2**:355-357.
69. **Moe GR, Bhandari TS, Flitter BA.** 2009. Vaccines containing de-N-acetyl sialic acid elicit antibodies protective against *Neisseria meningitidis* groups B and C. *J Immunol* **182**:6610-6617.
70. **Meijerink M, Ferrando ML, Lammers G, Taverne N, Smith HE, et al.** 2012. Immunomodulatory effects of *Streptococcus suis* capsule type on human dendritic cell responses, phagocytosis and intracellular survival. *PLoS One* **7**:e35849.
71. **Segura M, Vanier G, Al-Numani D, Lacouture S, Olivier M, et al.** 2006. Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a whole-blood culture system. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**:92-106.
72. **Segura M, Stankova J, Gottschalk M.** 1999. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infect Immun* **67**:4646-4654.
73. **Vallejo JG, Baker CJ, Edwards MS.** 1996. Roles of the bacterial cell wall and capsule in induction of tumor necrosis factor alpha by type III Group B streptococci. *Infect Immun* **64**:5042-5046.
74. **Vallejo JG, Baker CJ, Edwards MS.** 1996. Interleukin-6 production by human neonatal monocytes stimulated by type III Group B streptococci. *J Infect Dis* **174**:332-337.

75. **Meltzer U, Goldblatt D.** 2006. Pneumococcal polysaccharides interact with human dendritic cells. *Infect Immun* **74**:1890-1895.
76. **Kocabas C, Katsenelson N, Kanswal S, Kennedy MN, Cui X, et al.** 2007. *Neisseria meningitidis* type C capsular polysaccharide inhibits lipooligosaccharide-induced cell activation by binding to CD14. *Cell Microbiol* **9**:1297-1310.
77. **Carlin AF, Uchiyama S, Chang YC, Lewis AL, Nizet V, et al.** 2009. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood* **113**:3333-3336.
78. **Ando M, Tu W, Nishijima K, Iijima S.** 2008. Siglec-9 enhances IL-10 production in macrophages via tyrosine-based motifs. *Biochem Biophys Res Commun* **369**:878-883.
79. **Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE.** 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* **29**:313-326.
80. **Maurer M, von Stebut E.** 2004. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* **36**:1882-1886.
81. **Lahrtz F, Piali L, Spanaus KS, Seebach J, Fontana A.** 1998. Chemokines and chemotaxis of leukocytes in infectious meningitis. *J Neuroimmunol* **85**:33-43.
82. **Dominguez-Punaro MC, Segura M, Plante MM, Lacouture S, Rivest S, et al.** 2007. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* **179**:1842-1854.
83. **Okazaki K, Kondo M, Kato M, Nishida A, Takahashi H, et al.** 2008. Temporal alterations in concentrations of sera cytokines/chemokines in sepsis due to Group B *Streptococcus* infection in a neonate. *Jpn J Infect Dis* **61**:382-385.
84. **Fan H, Williams DL, Zingarelli B, Breuel KF, Teti G, et al.** 2007. Differential regulation of lipopolysaccharide and Gram-positive bacteria induced cytokine and chemokine production in macrophages by Galpha(i) proteins. *Immunology* **122**:116-123.
85. **Lemire P, Houde M, Segura M.** 2012. Encapsulated Group B *Streptococcus* modulates dendritic cell functions via lipid rafts and clathrin-mediated endocytosis. *Cell Microbiol* **14**:1707-1719.
86. **Mogensen TH, Paludan SR, Kilian M, Ostergaard L.** 2006. Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *J Leukoc Biol* **80**:267-277.
87. **Mitchell D, Olive C.** 2010. Regulation of Toll-like receptor-induced chemokine production in murine dendritic cells by mitogen-activated protein kinases. *Mol Immunol* **47**:2065-2073.
88. **Zamze S, Martinez-Pomares L, Jones H, Taylor PR, Stillion RJ, et al.** 2002. Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* **277**:41613-41623.
89. **Moon EY, Lee JH, Oh SY, Ryu SK, Kim HM, et al.** 2006. Reactive oxygen species augment B-cell-activating factor expression. *Free Radic Biol Med* **40**:2103-2111.
90. **Houde M, Gottschalk M, Gagnon F, Van Calsteren MR, Segura M.** 2012. *Streptococcus suis* capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition. *Infect Immun* **80**:506-517.
91. **Segura M, Gottschalk M, Olivier M.** 2004. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infect Immun* **72**:5322-5330.

ANNEXE III, ARTICLE IX**“Exacerbated type II interferon response drives hypervirulence and toxic shock by an emergent epidemic strain of *Streptococcus suis*”**

Claude Lachance, Marcelo Gottschalk, Pehuén P. Gerber, Paul Lemire, Jiango Xu and Mariela Segura.

Publié dans: *Infect Immun.* **2013** Jun;81(6):1928-1939.

DOI: 10.1128/IAI.01317-12.

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

J'ai participé aux expériences *in vitro* de l'article, plus spécifiquement aux co-cultures de DCs et de cellules NK.

Exacerbated type II interferon response drives hypervirulence and toxic shock by an emergent epidemic strain of *Streptococcus suis*

Claude Lachance¹, Marcelo Gottschalk¹, Pehuén P. Gerber¹, Paul Lemire¹, Jiango Xu² and Mariela Segura^{1*}.

¹Laboratory of Immunology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada; ²State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China

Running title: Hypervirulence of an epidemic strain of *Streptococcus suis*

Keywords: *Streptococcus suis*; STSLS; mice; proinflammatory; interferon

* Corresponding author. Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada. Tel.: +1 450 773 8521, ext. 0080; fax: +1 450 778 8108.

Abstract

Streptococcus suis, a major porcine pathogen, can be transmitted to humans and cause severe symptoms. A large human outbreak associated with an unusual streptococcal toxic shock-like syndrome (STSLS) was described in China. Albeit an early burst of proinflammatory cytokines following Chinese *S. suis* infection was suggested to be responsible for STSLS case severity, the mechanisms involved are still poorly understood. Using a mouse model, the host response to *S. suis* infection with a North American intermediately pathogenic strain, a European highly pathogenic strain, and the Chinese epidemic strain was investigated by a whole-genome microarray approach. Proinflammatory genes were expressed at higher levels in mice infected with the Chinese strain than those infected with the European strain. The Chinese strain induced a fast and strong gamma interferon (IFN- γ) response by natural killer (NK) cells. In fact, IFN- γ -knockout mice infected with the Chinese strain showed significantly better survival than wild-type mice. Conversely, infection with the less virulent North American strain resulted in an IFN- β -subjugated, low inflammatory response that might be beneficial for the host to clear the infection. Overall, our data suggest that a highly virulent epidemic strain has evolved to massively activate IFN- γ production, mainly by NK cells, leading to a rapid and lethal STSLS

Abbreviations

CCL	chemokine ligand	MOI	multiplicity of infection
CPS	capsular polysaccharide	NK	natural killer
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand	STSLS	streptococcal toxic shock-like syndrome
CXCR3	CXC chemokine receptor 3	MLST	multilocus sequence typing
DC	dendritic cell	RT-qPCR	real-time reverse transcription-quantitative PCR
IFN	interferon	ST	sequence type
IRF1	interferon-regulatory factor 1	TNF	tumor necrosis factor
IRF-E	IRF-binding sequence element	TSS	toxic shock syndrome
ISRE	IFN-stimulated response element		
IL	interleukin		
KO	knock-out		
LPS	lipopolysaccharide		

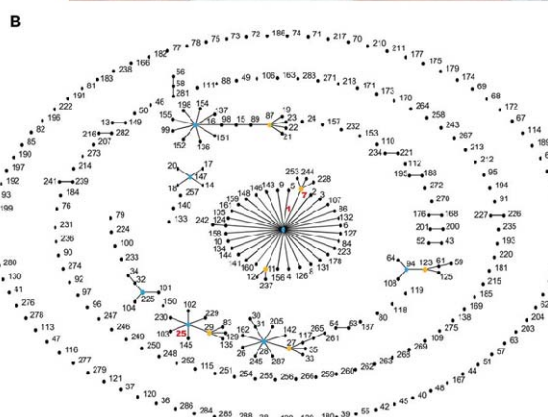
Introduction

Streptococcus suis, an encapsulated Gram-positive bacterium, is a major porcine pathogen endemic worldwide. It is responsible for a wide range of clinical symptoms in swine, such as meningitis, arthritis, endocarditis, pneumonia, and septicemia with sudden death, and causes vast economic losses in the swine industry. To date, 35 serotypes or capsular types of *S. suis* based on the capsular polysaccharide (CPS) composition have been described. *S. suis* serotype 2 is the type most commonly isolated from diseased animals and humans in most countries (1). Besides, *S. suis* serotype 2 is considered an emerging zoonotic pathogen, raising considerable international concerns among public health professionals. At the outset, infections in humans had usually been considered sporadic in people working with pigs or pork-derived products (1). After being an old neglected zoonotic infection for many decades, *S. suis* is now considered one of the most important emerging infectious diseases in Asian countries, where most people have regular contact with raw pork meat. In fact, *S. suis* has become the leading cause of adult meningitis in Vietnam, the second leading cause in Thailand, and the third leading cause in Hong Kong (2-4). In humans, *S. suis* usually produces a purulent meningitis, albeit other pathologies have been described (5, 6). The clinical characteristics typical of acute meningitis in humans caused by *S. suis* changed after the 2005 outbreak in the Chinese province of Sichuan (7). The most important feature of this outbreak was a high incidence of systemic disease with a high fatality rate and a relatively low number of meningitis cases (7). The clinical presentation was characterized as streptococcal toxic shock-like syndrome (STSLS), similar to that usually associated with *Streptococcus pyogenes* (7, 8) (Fig. 1A). Although the 2005 disease outbreak in China is the largest recorded outbreak of *S. suis* infection in humans, another smaller Chinese outbreak with the same clinical characteristics took place in Jiangsu Province in 1998 (9). The Chinese human outbreaks are the only ones reported with many patients presenting acute symptoms related to STSLS.

Interestingly, and differing from what has been observed in Europe and Asia, the prevalence of serotype 2 strains recovered from diseased pigs in North America remains relatively low compared to that of strains of other serotypes (10, 11). In addition, most zoonotic cases of *S. suis* in Western countries have taken place in Europe, and only three cases of human disease with *S. suis* serotype 2 have been reported on the mainland of the United States and Canada, with all of them being nonfatal (12). These observations led to

the hypothesis that Asian, European, and North American *S. suis* serotype 2 strains possess different potentials for virulence.

Multilocus sequence typing (MLST) has shown that many serotype 2 strains from North America belong to sequence type 25 (ST25), which differs from the sequence types of European and Asian isolates, which are mainly ST1 (13, 14). The clonal strain responsible



for both Chinese outbreaks was classified as ST7, a new sequence type included within the ST1 complex (Fig. 1B) (15). Although responsible for cases of STSLS, to date no typical superantigens could be found in this strain (9). It has been proposed that the ST7 strain recently evolved from a pathogenic ST1 strain, which in turn evolved from the intermediately virulent ST25 strain that is usually found in North America (16). After genome-wide comparisons (17-19), the contribution of diverse discrete genomic regions and polymorphisms to the different virulence traits of the MLST types remains speculative.

Fig. 1. *S. suis* MLST.

(A) A patient infected with the epidemic Chinese strain of *S. suis* presenting clinical signs of STSLS, featuring subcutaneous hemorrhage (purpura) in the leg. **(B)** MLST relationship of *S. suis* serotype 2 North American intermediately pathogenic strain 89-1591 (ST25), European highly pathogenic strain P1/7 (ST1), and Chinese epidemic strain SC84 (ST7). The whole *S. suis* MLST database (288 STs in total) is shown as a population snapshot obtained by eBURST (version 3). Each ST was represented by a single strain in the input population profile data. The linked clusters within the diagram represent clonal complexes. Primary founders and subgroup founders of these linked clusters are colored blue and yellow, respectively. Other unlinked individual STs are colored black. The three most important STs, ST7, ST1, and ST25, are labeled with red text to emphasize their significance.

The severity and outcome of infections caused by *S. suis* likely depend on the ability of host immune mechanisms to control bacterial growth and to limit the spread of the pathogen without causing excessive inflammation. Our laboratory previously developed a mouse model of *S. suis* systemic infection (20, 21). Infected animals can succumb rapidly, and this mortality can be associated with septic shock symptoms. Animals that survive the acute phase of infection might later develop clinical symptoms of meningitis. The characteristic type 1 inflammatory response that is witnessed following host infection by *S. suis* involves a complex proinflammatory cascade that includes the activation of various immune cells, as demonstrated *in vitro* and *in vivo* (1). As such, it has been suggested that increased expression of certain inflammatory mediators by the Chinese ST7 strain might be responsible for the severity of cases and STSLS (16). However, the patterns of the host response that drive the *S. suis* infection to a benign path, with eventual clearance of the pathogen, or an aggressive path, resulting in disease development, are poorly understood. Therefore, the goal of this study was to compare the innate immune response of the host following an acute infection by three different strains of *S. suis* having dissimilar virulence potentials: a representative typical intermediately pathogenic ST25 North American strain (89-1591) (22), a representative highly pathogenic ST1 European strain (P1/7) (23), and the epidemic Chinese ST7 strain responsible for the STSLS outbreaks in China (SC84) (16). A whole-genome approach was thus undertaken to evaluate and understand the modulation of host genes that might be crucial during the initial step of the host immune response to an infection by these three different *S. suis* strains, especially the highly virulent Chinese epidemic strain.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

S. suis serotype 2 strains 89-1591 (ST25, an intermediately pathogenic strain), P1/7 (ST1, a highly pathogenic strain), and SC84 (ST7, an epidemic strain) were used in this study. Strain 89-1591 was recovered from a case of pig septicemia in Canada (22), strain P1/7 was isolated from a case of pig meningitis in the United Kingdom (17), and strain SC84 was isolated from a patient with STSLS during the Chinese outbreak in 2005 (15). All the strains are encapsulated under the culture and assay conditions used. Bacteria were grown overnight on sheep blood agar plates (PML) at 37°C, and three colonies isolated from each

strain were inoculated into 5 ml of Todd-Hewitt broth (THB; Difco Laboratories), which was incubated for 8 h at 37°C without agitation. Working cultures were prepared by transferring 10 µl of 1/1,000 dilutions of 8-h cultures into 30 ml of THB, which was incubated for 16 h at 37°C. Bacteria were washed twice in phosphate-buffered saline (pH 7.3). The bacterial pellet was then resuspended and adjusted to a concentration of 5×10^8 CFU/ml. The inoculum for experimental infection was then diluted in THB to obtain a final concentration of 1×10^7 CFU/ml. This final suspension was plated onto sheep blood agar plates to accurately determine the number of CFU/ml and to verify the purity of the inoculum.

Mice and experimental infections

Six- to 8-week-old female C57BL/6 mice (Jackson Laboratory) were acclimatized to standard laboratory conditions with a 12-h light/12-h dark cycle and unlimited access to water and rodent chow. Age-matched gamma interferon (IFN-γ)-knockout (KO) mice (B6.129S7-*Ifng*^{tm1Ts}/J) were also purchased from the Jackson Laboratory. All experiments involving mice were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care. On the day of the experiment, a 1-ml volume of either the bacterial suspension (1×10^7 CFU/ml) or the vehicle solution (sterile THB) was administered by intraperitoneal injection. Mice were euthanized at 3 and 6 h postinfection for the microarray and real-time reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) study. For cytokine and chemokine analysis, mice were euthanized at 6 h postinfection. The dose of infection and postinfection times were selected on the basis of our previous work (21).

Measurement of blood bacterial loads

At each time point (3 h and 6 h postinfection), blood was collected by cardiac puncture and mixed with 40 µl of an EDTA (0.16 M) solution to prevent clotting. Proper dilutions of 50 µl of blood samples were plated using an Autoplate 4000 automated spiral plater (Spiral Biotech Inc.). Sheep blood agar plates were incubated overnight at 37°C. Colonies were counted and expressed as the number of CFU/ml.

Spleen collection, homogenization, and extraction of total RNA

At 3 and 6 h, spleens from euthanized mice were removed, cut in small pieces, and put into 1.5 ml of RNeasy lysis solution (Qiagen) for stabilization of total RNA. Approximately 25 mg of spleen was then disrupted and homogenized in 600 μ l of lysis buffer (Qiagen) using a rotor stator homogenizer (Tissue-tearor model 398; Biospec Products). Total RNA from homogenized tissue was isolated and purified using an RNeasy minikit with on-column DNase digestion (Qiagen) and kept at -80°C until use.

Illumina microarray analysis

The microarray experiment was performed at the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre (Montreal, Quebec, Canada), using the Illumina whole-genome expression Beadchip technology platform (Illumina). Prior to the microarray experiment, total RNA quality and quantity were assessed using an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies). The microarray was performed according to the manufacturer's instructions. Sample positions on the chip were randomly distributed.

Text files containing the signal and detection P values per probe for each sample were imported into FlexArray software v.1.6 (McGill University and Genome Quebec Innovation Centre). Data were first raw filtered in order to identify and remove probe sets that were not detected. The data with only present array features were then further preprocessed by applying a lumi filter to normalize specifically Illumina microarray data. Afterward, an analysis of variance (ANOVA) was used to search for differentially expressed genes between the infected and mock-infected groups or between infected groups in certain cases. In order to maintain manageable data sets, differentially expressed genes were defined by fold changes greater than 3-fold with an accompanying P value of ≤ 0.05 .

Validation of microarray data by real-time RT-qPCR

Fourteen genes were selected for the validation of microarray results by RT-qPCR. The qPCR analysis was executed to conform to the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiment (MIQE) guidelines (24). The validation experiments were performed using the same RNA samples that were used for the microarray study and

other supplemental samples. Extracted RNA was converted into cDNA by reverse transcription of 500 ng total RNA using an iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Then, qPCR assays were carried out using a SsoFast Evagreen supermix kit (Bio-Rad) and gene-specific primers (250 nM) on a CFX96 rapid thermal cycler system (Bio-Rad). The cycling conditions were 3 min of polymerase activation at 98°C, followed by 40 cycles at 98°C for 2 s and 57°C for 5 s. Melting curves were generated after each run to confirm the presence of a single PCR product.

All primers (Integrated DNA Technologies) that were used for detection of genes were verified to have reaction efficiencies of between 90 and 110% (see Supplemental Table 1 in the supplemental material). The GeNorm applet v.3.5 (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) was used to initially determine the two most stable reference genes from a set of five reference genes using random samples from the cDNA panel generated for the qPCR validation of the microarray. Therefore, normalization of the data was done using the reference genes β -actin and β 2-microglobulin. The fold change of gene expression was calculated using CFX software manager v.2.1 (Bio-Rad). Samples from mock-infected mice were used as a calibrator.

Luminex quantification of plasma cytokine and chemokine levels

Blood collected from mice euthanized at 6 h and stabilized with EDTA was centrifuged at $1,300 \times g$ for 10 min at 4°C. Plasma was then collected and kept at -80°C. Plasma concentrations of mouse CCL2 (monocyte chemotactic protein-1 [MCP-1]), CCL3 (macrophage inflammatory protein 1 α [MIP-1 α]), CCL4 (MIP-1 β), CXCL1 (keratinocyte-derived chemokine [KC]), CXCL2 (MIP-2 α), CXCL9 (monokine induced by IFN- γ [MIG]), CXCL10 (IFN- γ -induced protein 10 [IP-10]), IFN- γ , interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and tumor necrosis factor (TNF) were determined using a Milliplex custom-made 11-plex cytokine panel (Millipore) according to the manufacturer's instructions. Acquisition was performed on a Luminex 100 platform (Luminex), and analysis was performed using Beadview multiplex data analysis software v.1.0 (Upstate/Millipore).

NK and DC cocultures

Untouched natural killer (NK) cells were purified from naive C57BL/6 mice using NK cell isolation kit II microbeads and magnetically activated cell sorting negative selection (Miltenyi Biotec). Purified NK cells were expanded *in vitro* for 8 days in the presence of 500 ng/ml of recombinant mouse IL-2 (Miltenyi Biotec). The resulting NK cell purity was routinely >95% NK1.1⁺ and CD3⁻ (as determined by fluorescence-activated cell sorting using anti-mouse NK1.1 clone PK-136 and anti-mouse CD3 clone 145-2C11; BD Pharmingen). Bone marrow-derived dendritic cells (DCs) were produced as previously described (25). DC and NK cell cocultures were established at a ratio of 1:5 in complete medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, and 50 μ M 2-mercaptoethanol (Invitrogen). Cocultures were infected with 2.5×10^5 CFU of different *S. suis* strains. After a bacterium-cell contact time of 6 h, gentamicin (20 μ g/ml) was added to prevent cell toxicity. Supernatants were collected after a final 14 h of incubation, and IFN- γ levels were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; R&D Systems). Nonstimulated cells (medium alone) or cells stimulated with a combination of 1 μ M CpG (ODN 1826; Coley Pharmaceutical Inc.) and 1 μ g of lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich) served as negative and positive controls, respectively. In addition, single DC cultures were also included as controls.

Statistical analysis

Data are presented as survival curves, obtained using the Kaplan-Meier method; the mean \pm standard error of the mean (SEM); or the geometric mean with 95% confidence interval, where appropriate. Prism v.5 software (GraphPad) was used for data analysis. One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls secondary analysis was performed to find statistical differences between groups. Log-rank (Mantel-Cox) tests were used to compare the survival curves of the different groups studied, and alpha levels were adjusted to a Bonferroni-corrected threshold for multiple comparisons. *P* values of < 0.05 were considered statistically significant.

Microarray data accession numbers

The microarray raw data files were deposited and are available in the Gene Omnibus Expression database under accession numbers GSE41520, GSE41521, and GSE41522.

Results

*Difference in virulence among North American, European, and Chinese representative strains of *S. suis* serotype 2*

It is hypothesized that the epidemic Chinese SC84 strain is more virulent than the highly pathogenic European P1/7 strain, with the intermediately pathogenic North American 89-1591 strain being the least virulent. However, the virulence of these representative strains of the ST7, ST1, and ST25 MLST types has never been evaluated in a well-standardized comparative experimental mouse model. Using our C57BL/6 mouse model of systemic infection (21), we showed that the survival of mice infected with the North American 89-1591 strain was not significantly affected and thus similar to that of mock-infected mice ($P = 0.5$). These mice showed mild or no clinical signs of disease (Fig. 2A). However, the survival of mice infected with *S. suis* European highly pathogenic strain P1/7 or Chinese epidemic strain SC84 was significantly different from that of mock-infected mice, with P being equal to 0.026 and 0.004, respectively. Similarly, mice infected with these strains had significantly different survival than mice infected with North American strain 89-1591 ($P = 0.008$ and $P = 0.0002$ for P1/7 and SC84, respectively). Finally, there was also a significant difference in the survival of mice infected with the European P1/7 strain and mice infected with the Chinese SC84 strain ($P = 0.024$). Chinese strain-infected mice had a 50% survival rate at 17 h, while mice infected with the European strain had a 50% survival rate at 44 h (Fig. 2A). Hence, our infection data support the hypothesis that *S. suis* strain ST7 is more virulent than an ST1 European strain, with the ST25 North American strain being the least virulent of all three strains.

ST-specific virulence degrees are not related to differences in bacteremia levels

Having shown intrinsic variations in virulence among ST types of *S. suis*, we further investigated whether these differences correlate with bacterial capacity to survive and

disseminate in the bloodstream. First, we confirmed *in vitro* that growth rates in THB culture medium were similar among the 89-1591, P1/7, and SC84 strains during either the exponential or the stationary phase of growth (see Supplemental Fig. 1 in the supplemental material). Next, blood bacteremia was assessed in 89-1591-, P1/7-, or SC84-infected mice. At 3 h postinfection, all mice were bacteremic and the blood bacterial burden was similar in mice infected with either the European or the Chinese strain (Fig. 2B). Mice infected with the North American 89-1591 strain had an approximately 1- \log_{10} -unit lower blood bacterial burden than the other two groups of infected mice ($P < 0.001$). However, at 6 h postinfection, *S. suis* bacteremia levels were similar in mice infected with either of the evaluated strains, with no significant differences being detected between the three groups (Fig. 2B). These data suggest a delayed capacity of strain 89-1591 to establish infection, rather than a higher susceptibility of this strain to bacterial clearance by the host.

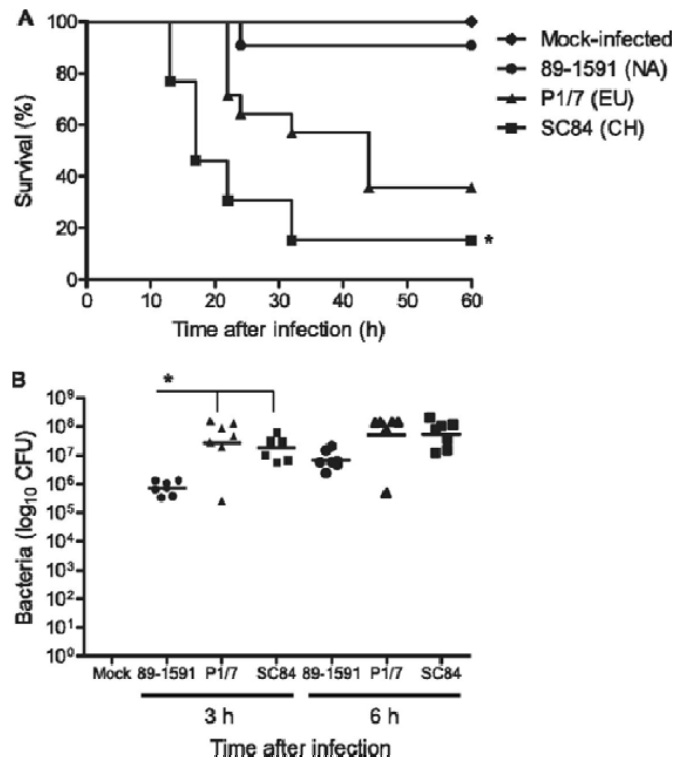


Fig. 2. The *S. suis* epidemic Chinese strain is more virulent than the highly pathogenic European strain and the intermediately pathogenic North American strain

A) Survival curves for C57BL/6 mice intraperitoneally infected with 1×10^7 CFU of *S. suis* strains originating from North America (89-1591), Europe (P1/7), or China (SC84). As controls (mock infected), animals were injected with the same broth that was used to grow the bacterial strains (Todd-Hewitt broth) ($n = 14$ for mice infected with each of *S. suis* strains; $n = 5$ for mock-infected mice). *, significantly different ($P \leq 0.05$) compared to P1/7-, 89-1591-, or mock-infected mice, as determined by the log-rank (Mantel-Cox) test. **(B)** Blood bacteremia of C57BL/6 mice infected with the North American (89-1591), the European (P1/7), or the Chinese (SC84) strain of *S. suis*. C57BL/6 mice ($n = 7$ per group) were intraperitoneally infected as described for panel A. At 3 h and 6 h postinfection, mice were euthanized, bacteria from blood were plated, and colonies were

counted and expressed as the number of CFU/ml. *, significantly different ($P \leq 0.05$) compared to mice infected for 3 h with the European P1/7 or the Chinese SC84 strain of *S. suis*, as determined by one-way ANOVA.

In agreement with the findings of previous studies (20, 21, 26), patterns of bacterial burdens observed in spleen and liver were similar to those observed in blood samples, with no significant differences being detected among strains (data not shown). These results suggest that the increased virulence of *S. suis* ST7 cannot be explained by an increase in blood bacterial burden and that other factors account for its pathogenic potential.

The number and level of upregulated proinflammatory genes correlate with S. suis virulence degree

To explore the molecular basis of the increased virulence of the *S. suis* ST7 epidemic strain, a gene expression microarray study was undertaken to provide a global view of the gene expression profile in *S. suis*-infected mice. An Illumina whole-genome microarray assay was performed on spleen samples from C57BL/6 mice infected with the 89-1591, P1/7, or SC84 *S. suis* strain. Mock-infected mice were used as controls. Mice were euthanized at 3 or 6 h postinfection, and total RNA was isolated from the spleen and used for the microarray analysis in order to explore early innate immune mechanisms that might be associated with the rapid onset of death observed after infection with the Chinese strain (Fig. 2A).

Gene expression was considered significantly modified when their corrected P values were < 0.05 and the change of expression was more than 3-fold compared to that in mock-infected mice. At 3 h postinfection, the majority of changes in gene expression were due to upregulation, while very few genes were downregulated (Fig. 3A and B). Interestingly, the number of genes specifically upregulated at 3 h postinfection with the Chinese SC84 strain was higher than that observed in the other two groups of infected mice (Fig. 3B). At 6 h postinfection, the majority of changes in gene expression were also due to upregulation, with the total number of modified genes being much higher than that observed at 3 h for mice infected with either of the *S. suis* strains (Fig. 3C and D). Furthermore, there was an even more pronounced difference in the total number of genes exclusively modified at 6 h in mice infected with the Chinese SC84 strain than mice infected with either the North

American 89-1591 strain or the European P1/7 strain. These observations might correlate with the ability of the Chinese epidemic strain to induce a rapid onset of death after infection, as shown in Fig. 2A.

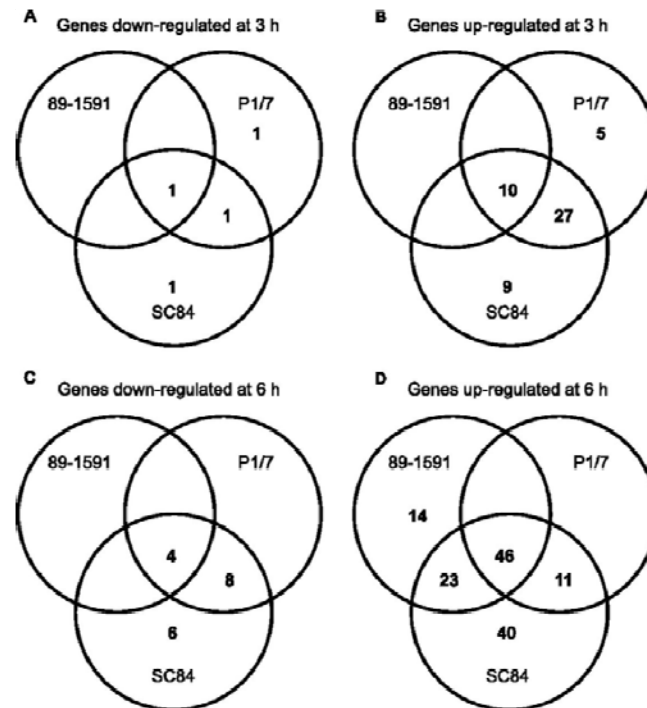


Fig. 3. Host genes are modified in greater numbers in C57BL/6 mice infected with the epidemic Chinese strain of *S. suis* than mice infected with either the highly pathogenic European or intermediately pathogenic North American strains.

(A to D) Venn diagrams showing the total number of genes modified in C57BL/6 mice ($n = 4$ per group) infected for 3 and 6 h with different strains of *S. suis* (North American [89-1591], European [P1/7], or Chinese [SC84]) compared to their expression in mock-infected mice, as determined by the Illumina microarray study. Differentially expressed genes were defined by a fold change greater than 3-fold (upregulation or downregulation) with an accompanying P value of ≤ 0.05 .

Gene expression modifications in infected mice were then clustered by functions. Table 1 provides important genes which were upregulated at 6 h postinfection. The entire list of genes modified at 3 h postinfection can be found in Supplemental Tables 2 and 3 in the supplemental material. Genes upregulated or downmodulated at 6 h postinfection are displayed in Supplemental Tables 4 and 5 in the supplemental material. Downregulated

genes did not provide useful insights into the immunopathogenesis of *S. suis* infection. On the other hand, upregulated gene functions predominantly related to immune response, such as cell adhesion and migration, transcriptional and translational regulation, cytokine signaling, and expression of cytokines, chemokines, and related receptors, were found. In particular, we observed that expression of the proinflammatory mediators CCL2, CCL3, CCL4, CCL7, CXCL1, CXCL2, IL-1 α , IL-1 β , and IL-6 was overall higher in mice infected with the Chinese SC84 strain than mice infected with either of the other strains (Table 1; see Supplemental Tables 2 and 4 in the supplemental material). Moreover, mice infected with the North American strain presented in general the lowest levels of expression of proinflammatory cytokine, chemokine, and related genes. From these data, we might assume that mice infected with the Chinese ST7 strain develop a stronger and earlier proinflammatory response than mice infected with ST1 or ST25 *S. suis* strains.

Gene expression was next analyzed by real-time RT-qPCR to confirm and validate the results obtained from the Illumina microarray assay. As shown in Table 1, our RT-qPCR results for selected genes followed the same trends obtained by microarray analysis. Differences in gene expression among groups of infected mice were confirmed or even amplified using this more powerful and quantitative technique, as reported previously (27). In accordance with our microarray data, mice infected with the Chinese strain had the highest expression of genes for proinflammatory mediators. European strain-infected mice for the most part had an intermediate level of expression of these genes, and North American strain-infected mice presented the lowest level of expression of these genes (Table 1). These differences in gene expression were confirmed by Luminex analysis of secreted protein levels in plasma at 6 h postinfection (Fig. 4).

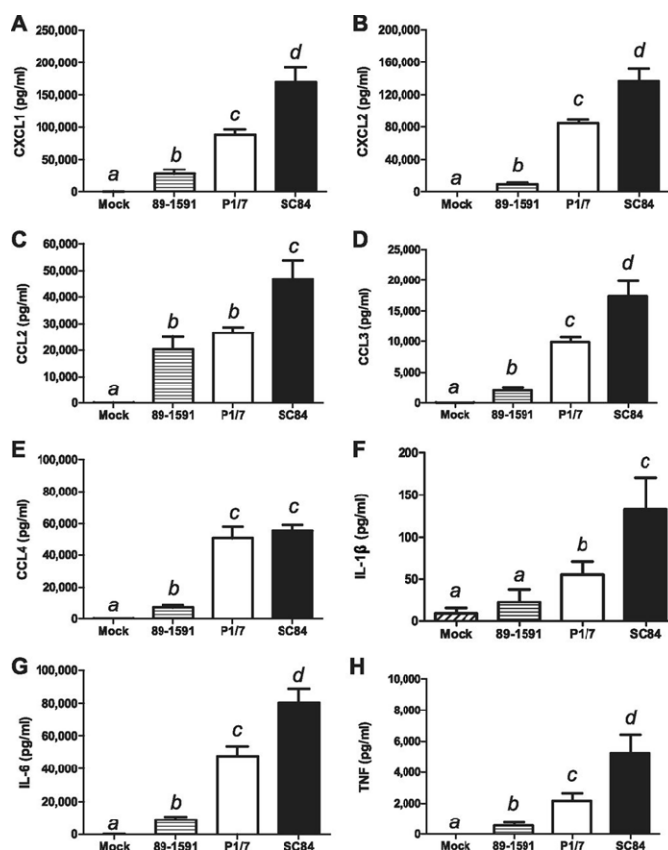


Fig. 4. Proinflammatory cytokines and chemokines are highly expressed in mice infected with the epidemic Chinese strain of *S. suis*.

Plasma levels of CXCL1(A), CXCL2 (B), CCL2 (C), CCL3 (D), CCL4 (E), IL-1 β (F), IL-6 (G), and TNF (H) proteins in C57BL/6 mice ($n = 7$ per group) infected with 1×10^7 CFU of the intermediately pathogenic North American (89-1591), highly pathogenic European (P1/7), or epidemic Chinese (SC84) *S. suis* strain for 6 h, as quantified by Luminex assay, are shown. Data represent mean values (in pg/ml) \pm SEMs. Groups that are significantly different ($P \leq 0.05$), as determined by one-way ANOVA, are indicated by letters (a, b, c, and d).

TNF is a powerful proinflammatory cytokine usually associated with septic shock, and it is produced very fast upon infection (28). Maximal mRNA expression levels were observed at 3 h postinfection in mice infected with the Chinese or the European strain, reaching levels higher than those observed in the North American strain-infected mice (Table 1). In fact, induction of TNF gene expression was delayed in the latter group of mice (see Supplemental Tables 2 and 4 in the supplemental material). As for most other cytokines, TNF protein levels in plasma were higher in mice infected with the Chinese SC84 strain than the two other groups of mice (Fig. 4).

A balance between type I and type II interferon responses determines the capacity to control infection or the development of fatal STSLS

Aforementioned data highlighted the capacity of an epidemic strain to induce an exacerbated proinflammatory response that might be associated with STSLS. Since to date none of the usual superantigens that are typically responsible for this clinical manifestation have been shown to be produced by the ST7 strain responsible for the outbreak (9, 17), other mechanisms might be involved. Microarray data indicated a stronger induction of type II interferon (IFN- γ) gene expression in Chinese strain-infected mice than the other infected mouse groups (see Supplemental Table 4 in the supplemental material). Thus, we hypothesized that a cascade of IFN- γ -related inflammatory events might be responsible for STSLS. Using both RT-qPCR and the Luminex assay, we demonstrated that significantly higher levels of IFN- γ are produced in mice infected with the epidemic SC84 strain than mice infected with either the North American 89-1591 strain or the European P1/7 strain (Fig. 5A and C). Since IFN- γ is known to be a master regulator of inflammation (29), we decided to further explore other genes that might be related to this increased IFN- γ expression.

Interferon-regulatory factor 1 (IRF1), a transcription factor that is mainly induced by the IFN- γ signaling pathway, is involved in many aspects of innate and adaptive immune responses. IRF1 drives inducible expression of many target genes through interaction with the IRF-binding sequence elements (IRF-Es). This specificity overlaps that of IFN-stimulated response elements (ISREs). In this way, IRF1 is able to induce a subset of the full spectrum of IFN-inducible genes (29, 30). Compared to mock-infected mice, IRF1 mRNA expression was upregulated only in the Chinese strain-infected mice in the microarray assay (see Supplemental Table 4 in the supplemental material). A significantly higher IRF1 expression in mice infected with this epidemic SC84 strain than in the other two groups of mice was confirmed by RT-qPCR (Fig. 5E), a condition that is analogous to the IFN- γ expression data. Furthermore, the expression of CXCL9, a chemokine induced by the IFN- γ cascade (31), was also significantly higher in strain SC84-infected mice than European strain-infected mice, as determined by RT-qPCR and Luminex assay (Fig. 5G and I). CXCL10, a chemokine gene that can be upregulated in response to the IFN- γ /IRF1 signaling pathway (32), also saw its expression significantly upregulated in the epidemic SC84 strain-infected mice compared to the level of expression in the European strain-infected mice (Fig. 5F and H). Altogether, these findings suggest a role of the IFN- γ loop in the exacerbated inflammatory response induced by the Chinese strain.

Unexpectedly, CXCL9 and CXCL10 were also expressed at a significantly higher level in North American 89-1591 strain-infected mice than in European P1/7 strain-infected mice (Fig. 5F to I). The higher gene and protein expression levels of these two chemokines in the group of mice infected with the North American 89-1591 strain could not be explained by an increase in IFN- γ levels, because IFN- γ expression was similar to that in mice infected with the European P1/7 strain (Fig. 5A and C).

To better understand the immunopathogenesis of an ST25 *S. suis* strain, we searched for the expression of genes for type I interferons since it has been demonstrated that they can also contribute to CXCL9 and CXCL10 induction (33, 34). RT-qPCR analysis confirmed our hypothesis, as extremely high levels of IFN- β mRNA expression were observed in mice infected with the North American 89-1591 strain compared to those observed in the other infected mouse groups (Fig. 5B). In agreement with these results, expression of IRF7, the master regulator of type I interferon-dependent immune responses

(35), was also markedly increased in North American 89-1591 strain-infected mice compared to animals infected with either the ST1 or the ST7 strain (Fig. 5D; see Supplemental Table 4 in the supplemental material). These data suggest preferential induction of the type I interferon loop during ST25 *S. suis* infection.

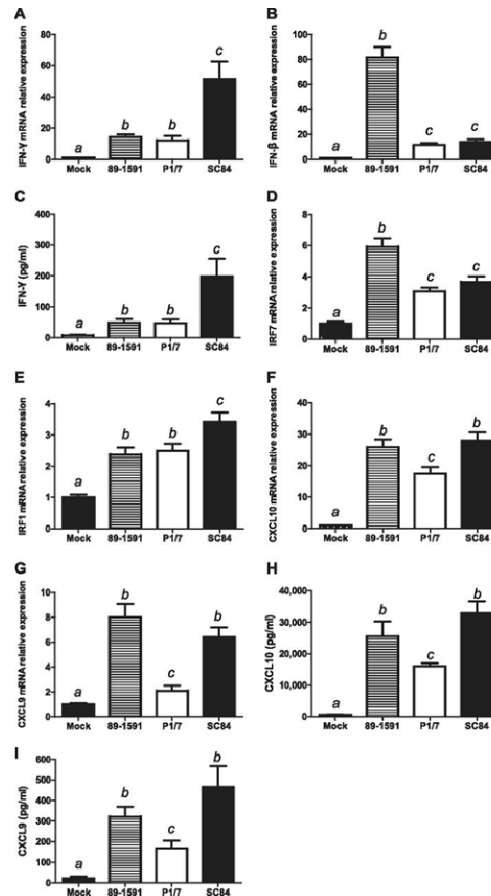


Fig. 5. Type I and II IFN pathways are differently expressed in C57BL/6 mice infected with the intermediately pathogenic North American, the highly pathogenic European, or the Chinese epidemic strain of *S. suis*.

(A, B, and D to G) Quantitative PCR analysis of expression of *Ifn γ* , *Ifn β* , and related genes in C57BL/6 mice ($n = 7$ per group) infected with 1×10^7 CFU of the North American (89-1591), the European (P1/7), or the Chinese (SC84) strain of *S. suis*. Total RNA was isolated from spleen samples at 6 h postinfection. Data represent mean values \pm SEMs of the relative fold expression in infected groups compared to that in the reference mock-infected group. (C, H, and I) Plasma levels of IFN- γ (C), CXCL10 (H), and CXCL9 (I) proteins in C57BL/6 mice infected for 6 h with 1×10^7 CFU of the North American, the European, or the Chinese strain of *S. suis* ($n = 8$ per group). Data represent mean values (in pg/ml) \pm SEMs. Groups that are significantly different ($P \leq 0.05$), as determined by one-way ANOVA, are indicated by letters (a, b, c, and d).

The STSLS phenotype of the epidemic ST7 S. suis strain is reversed in IFN- γ -deficient mice

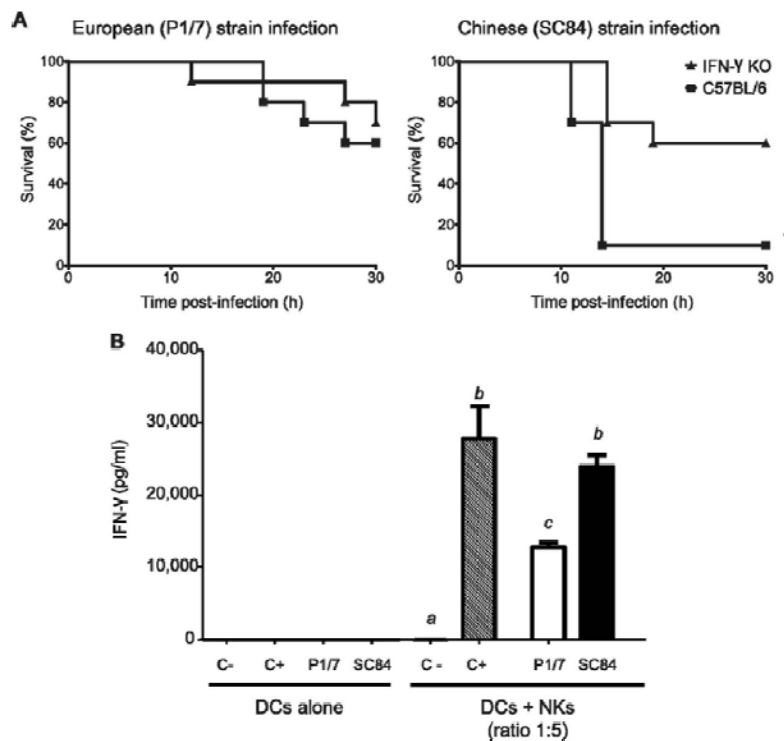
In order to confirm our hypothesis that the IFN- γ pathway plays a major role in the pathology of the disease caused by an infection with the *S. suis* epidemic Chinese SC84 strain, IFN- γ -KO mice were infected with either the SC84 strain or the European P1/7 strain and survival was monitored. As expected, C57BL/6 mice infected with the Chinese strain quite rapidly succumbed to the infection (Fig. 6A). Remarkably, IFN- γ -KO mice showed increased resistance to an infection with the epidemic strain. Indeed, at 48 h postinfection, 50% of the IFN- γ -KO mice were still alive ($P < 0.05$ compared to Chinese strain-infected C57BL/6 mice). In contrast, IFN- γ -KO mice infected with the European ST1 strain of *S. suis* had a survival curve similar to that of their infected C57BL/6 mouse counterparts ($P = 0.89$; Fig. 6A). This finding is in agreement with the low levels of IFN- γ production induced by the European P1/7 strain, as shown in Fig. 5.

It should be noted that no significant difference in survival levels was observed between C57BL/6 mice infected with the European strain and IFN- γ -KO mice infected with the Chinese strain ($P = 0.54$). These data indicate that the absence of IFN- γ led to a reversal of pathological symptoms in mice infected with the ST7 epidemic strain, as they reacted phenotypically in a way similar to that for wild-type mice infected with an ST1 European strain (Fig. 6A). Taken together, these results support an important role for IFN- γ in the increased inflammatory state of the host during the acute phase of severe *S. suis* infection and suggest that its excessive expression is a major factor leading to lethal STSLS.

The ST7 epidemic strain induces a strong IFN- γ response by NK cells

IFN- γ -dependent pathology is known to contribute to lethality in bacterial superantigen-induced toxic shock syndrome (TSS), which is characterized by a robust T cell activation by the superantigens (36). Since the presence of genes homologous to typical superantigens has not been detected so far in the epidemic clone, we hypothesized that *S. suis* ST7 has developed alternative mechanisms to overactivate NK cells to induce exacerbated levels of IFN- γ during the acute phase of the infection. We thus analyzed IFN- γ levels in NK cell-DC cocultures infected *in vitro* with either the epidemic ST7 strain or the European ST1 *S. suis* strain. The Chinese SC84 strain induced a strong IFN- γ response by

NK cell-DC cocultures which was as high as that induced by a combination of CpG and LPS (used as a positive control). Compared to the epidemic strain, the ST1 strain P1/7 presented a reduced capacity to activate NK cells *in vitro* (Fig. 6B). It should be noted that DCs alone



(Fig. 6B) or NK cells alone (not shown) failed to secrete IFN-γ upon bacterial infection. This is in agreement with several reports indicating that activation of NK cells by extracellular pathogens (in contrast to virus-infected or transformed cells) seems to be indirect and results from signals provided by accessory cells, such as DCs (37).

Fig. 6. IFN-γ exacerbates the host response following an infection by the epidemic Chinese strain of *S. suis*: role of NK cells.

A) Survival curves for C57BL/6 or B6.129S7-*Ifng*^{tm1Ts/J} (IFN-γ-KO) mice ($n = 10$ per group) intraperitoneally infected with 1×10^7 CFU of the highly pathogenic European or the epidemic Chinese *S. suis* strain. *, significantly different ($P \leq 0.05$) compared to IFN-γ-KO mice infected with the Chinese strain of *S. suis*, as determined by the log-rank (Mantel-Cox) test. **(B)** IFN-γ levels were measured in DC and NK cell cocultures (ratio, 1:5) infected *in vitro* with either the epidemic Chinese *S. suis* strain (SC84) or the highly pathogenic European *S. suis* strain (P1/7) (2.5×10^5 CFU). After a bacterium-cell contact incubation time of 6 h, gentamicin was added to kill the bacteria and prevent cell toxicity. Supernatants were collected at 14 h of incubation, and IFN-γ levels were measured by ELISA. Nonstimulated cells (medium alone) or cells stimulated with a combination of CpG and LPS served as negative (C-) and positive (C+) controls, respectively. In addition, single-DC cultures were also included as controls. Data represent mean values (in pg/ml) \pm SEMs of eight distinct experiments. Groups that are significantly different ($P \leq 0.05$), as determined by one-way ANOVA, are indicated by letters (a, b, and c).

Discussion

TSS caused by the superantigen exotoxins of *Staphylococcus aureus* and *S. pyogenes* is characterized by robust T cell activation and a profound elevation in systemic levels of multiple cytokines, including IFN- γ , TNF, IL-1, and IL-6, followed by the dysfunction of multiple organs and often death (36, 38). Gene gain via the horizontal acquisition of mobile genetic elements is a key factor in the emergence of new pathogenic strains of streptococci. For example, acquisition of superantigen-encoding genes by *S. pyogenes* has been associated with increased morbidity and mortality in humans (39, 40). The emergence of a new, epidemic ST of *S. suis* during the Chinese outbreak leading to unusual clinical manifestations related to STSLS allowed the hypothesis of the acquisition of superantigens by this important zoonotic pathogen to arise as well. However, and in spite of extensive whole-genome analysis (9, 16-18), no homology with known superantigens has so far been identified in the *S. suis* epidemic ST7 strain. Thus, in order to dissect the mechanisms underlying the emergence of a new pathogenic strain of *S. suis*, we performed a comparative analysis of the whole mouse genome. We demonstrated here for the first time that unbalanced host type II and type I interferon responses dictate the disease outcome and clearly discriminate between a newly emerged hypervirulent clone from the less virulent *S. suis* STs. Indeed, our study further contributed to an understanding of the mechanism(s) used by this new epidemic strain to induce STSLS and death.

Innate immunity is especially important in order to mount an immediate defense in response to pathogens. This inflammatory process plays a key role in eliminating bacteria and regulates many cells through the release of cytokines and chemokines. On the other hand, excessive inflammation has damaging effects, which can lead to severe symptoms, such as septic shock. In this regard, the increased severity of *S. suis* infections in humans observed in China, including a shorter incubation time (as short as 9 h after the onset of illness), rapid disease progression (the median time from disease onset to death was 23 h), sudden death, and higher mortality (64% in patients with STSLS) (7, 9, 16), correlates with an overzealous and inappropriate inflammatory response. Clinical and epidemiologic data for patients infected during the Chinese outbreak showed that during the early phase of the disease, serum levels of IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF were extremely high (16). These observations are in agreement with our present results obtained using a mouse model of infection. Cytokine levels, but not bacterial burden, correlate with the degrees of virulence of

ST7, ST1, and ST25 strains. Among several proinflammatory mediators, this study identified the IFN- γ /IRF1 pathway to be a major pathway that could be related to the STSLS induced by the epidemic strain. Indeed, in the absence of IFN- γ (KO mice), a reversion of the ST7 phenotype was observed, as KO mice presented a survival rate similar to that for mice infected with an ST1 strain. By enhancing chemotaxis and phagocytic killing, IFN- γ is expected to contribute to bacterial clearance in the infected host (29). On the other hand and as mentioned above, IFN- γ may directly mediate pathological changes and lethality, probably in conjunction with other proinflammatory mediators such as TNF (41). It is known that IFN- γ induces activation of the transcription factor STAT1, which can then trigger activation of IRF1 (29). These two proteins can subsequently activate transcription of certain IFN- γ -induced genes, such as CXCL10 (32) and CXCL9 (31), resulting in enhanced expression of these two chemokines, as shown in this study. Synergistic promoter activation can also take place following cooperation between STAT1/IRF1 and NF- κ B, with the latter being activated after TNF stimulation (42-44). Furthermore, the combination of IFN- γ and TNF can induce even higher levels of IRF-1 mRNA (30). Thus, our findings of higher IRF1 gene activation and TNF production in mice infected with the epidemic strain suggest that synergistic interactions between IFN- γ and TNF might contribute to the increased mortality observed in animals infected with the epidemic *S. suis* strain. As IL-1 β is also highly induced by an infection with the epidemic strain, similar synergies between the IFN- γ and IL-1 β pathways may also contribute to amplification of a fatal inflammatory loop (32).

NK cells have sophisticated biological functions and are key actors in innate immunity. NK cell-derived cytokines, such as IFN- γ , enhance the innate immune response and shape the subsequent adaptive immune response (45). We showed here that these cells respond to the epidemic strain by releasing large amounts of IFN- γ , the central player in the inflammatory cascade exacerbated during infection by this strain. Moreover, the IFN- γ -induced CXCL9 and CXCL10 chemokines share the ability to signal through CXC chemokine receptor 3 (CXCR3), which is present on NK cells. Ligand binding to the receptor results in further activation and recruitment of these cells to sites of inflammation. In addition, IRF1 is also known to influence the function of NK cells (30). A critical role of NK cells in LPS-induced lethal shock in mice has been reported, with NK cells being the major IFN- γ producers (46, 47). Similarly, a clinical study reported that high NK cell counts in blood at early time points predict mortality in severe sepsis (48). This immunopathological process

differs from the sepsis disease induced by a typical pathogenic European ST1 strain of *S. suis*. The fact that IFN- γ does not seem to play a fatal role during infection with an ST1 strain of *S. suis* is in agreement with the finding observed for *Streptococcus pneumoniae*-infected IFN- γ receptor-deficient (IFN- γ R^{-/-}) mice. In these studies, the mortality rate for IFN- γ R^{-/-} mice resembled that for infected wild-type mice (49).

While investigating the participation and the contribution of IFN- γ to the aberrant host inflammatory response during infection by the Chinese *S. suis* strain, we observed similarly elevated levels of CXCL9 and CXCL10 in mice infected with a North American *S. suis* strain. In the case of the latter strain, the elevated expression of these chemokines could not be explained by elevated IFN- γ expression. Instead, these mice showed elevated expression of the type I interferon IFN- β . Historically, type I IFN responses were primarily considered to be unique to viral infections; however, this view has recently changed, as these IFNs are also induced after exposure to bacteria and pathogen-associated molecules (50, 51). There is a substantial overlap between IFN- β -inducible and IFN- γ -inducible genes; however, IFN- β can activate transcription of another set of IFN-stimulated genes via ISRE (51). In this regard, our data indicated a preferential upregulation of IRF7 over IRF1 in mice infected with the North American strain. As production of IFN- β has been shown to be regulated by a positive-feedback loop where IRF7 is implicated (35, 52), the upregulation of this IRF pathway by the North American strain may explain the enhanced type I IFN response in mice infected by this strain. Albeit IRF1 is also known to bind the IFN- β promoter and IFN- β itself can contribute to IRF1 induction (30), this pathway is not activated by an infection with the Chinese ST7 strain (which induces a very low IFN- β response), which seems to divert the system toward a mostly exclusive type II interferon response (53). Conversely, the IRF-1/IFN- β amplification loop might also contribute to the immune response against an ST25 strain in parallel with the major IRF7/IFN- β pathway. This is suggested by moderate levels of IRF1 activation in the absence of significant IFN- γ production by an ST25 infection. Similarly, *Mycobacterium tuberculosis*-infected human DCs have been shown to induce IFN- β , followed by upregulation of IRF1 and IRF7 (54). The observed upregulation of IRF7 by an ST25 *S. suis* infection differs from the gene expression observed in other pathogenic *Streptococcus* species. For instance, *S. pneumoniae* and *S. pyogenes* induce IFN- β expression through a signaling cascade involving IRF3 (55-57).

As mentioned above, CXCL9 and CXCL10 recruit NK cells. However, these cells do not seem to play an important role during infection with an ST25 *S. suis* strain, as they are poorly activated by this strain *in vitro* (unpublished observations). As such, these two chemokines might play a different role in the context of an ST25 infection. CXCL9 and CXCL10 are also known to recruit and activate T cells, which might lead to the development of a protective response (33). In fact, the role of type I IFNs in bacterial diseases is controversial, and most studies have focused on intracellular bacteria. Signaling through the type I IFN pathway can have harmful effects in some bacterial infections and beneficial consequences in others (55, 58-62).

In conclusion, this *in vivo* whole-genome comparative study provided for the first time a deeper understanding of the host response to *S. suis* infections by showing that a newly emerged ST7 epidemic clone of *S. suis* responsible for the Sichuan outbreak in 2005 has evolved from an ST1 clone to overexpress IFN- γ . The use of a mouse model known to be poorly sensitive to superantigens and the current failure in revealing the presence of superantigens in the ST7 clone suggest that alternative mechanisms leading to increased virulence and IFN- γ production, probably by NK cells, may be used by this strain to provoke STSLS. Conversely, the less virulent ST25 *S. suis* strain (present mainly in North America) results in an IFN- β -subjugated, low inflammatory response that might be beneficial for the host in order to clear the infection.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to M.S. (grant 342150-07) and to M.G. (grant 154280), as well as NSERC Discovery Accelerator Supplement 380299 to M.G. Additional funding support was provided by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) China-Canada Joint Health Research Initiative to M.S., M.G., and J.X. C.L. is the recipient of a Fonds de Recherche du Québec—Nature et Technologies (FRQ-NT) postdoctoral award. P.L. is the recipient of a FRQ-NT Ph.D. award.

We thank Sonia Lacouture and Maria Eugenia Bergman for invaluable technical assistance.

TABLES

Table I. Validation of microarray gene expression using real-time RT-qPCR in C57BL/6 mice infected with different *S. suis* strains for 6 h.

Gene	RNA quantification method	Fold increase in expression ^a		
		89-1591	P1/7	SC84
<i>Cxcl1</i> (<i>Kc</i>)	Microarray	12	20	35
	qRT-PCR	44 ± 5	98 ± 11	142 ± 16
<i>Cxcl2</i> (<i>Mip-2</i>)	Microarray	5.2	6.6	16
	qRT-PCR	74 ± 14	230 ± 23	326 ± 43
<i>Ccl3</i> (<i>Mip-1α</i>)	Microarray	24	28	46
	qRT-PCR	62 ± 9	108 ± 5	143 ± 11
<i>Ccl4</i> (<i>Mip-1β</i>)	Microarray	33	38	53
	qRT-PCR	55 ± 8	97 ± 5	115 ± 8
<i>Ccl7</i> (<i>Mcp-3</i>)	Microarray	4.6	3.8	11
	qRT-PCR	30 ± 5	34 ± 3	79 ± 6
<i>Il1β</i>	Microarray	2.9	2.5	4.3
	qRT-PCR	2.5 ± 0.3	1.8 ± 0.3	3.7 ± 0.3
<i>Il6</i>	Microarray	2.7	2.2	6.0
	qRT-PCR	284 ± 40	680 ± 76	1,003 ± 108
<i>Tnf</i>	Microarray ^b	3.9	9.3	10
	qRT-PCR ^b	3.1 ± 1.1	9.0 ± 1.4	13 ± 3.1

a. Values represent the mean fold increase in expression in spleens of infected mice compared to that in spleens of mock-infected C57BL/6 mice for the microarray analysis and the mean fold increase ± SEM for RT-qPCR. Data are for 4 mice per group for the microarray analysis and 7 mice per group for the RT-qPCR assay. The strains were from North America (89-1591), Europe (strain P1/7), and China (strain SC84).

b. For *Tnf* gene expression, data presented are from mice infected for 3 h.

SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental Table I. Primer sequences used for real-time RT-qPCR

Gene	Genebank ID	Amplicon size	Forward Sequence	Reverse Sequence	Span intron	PCR efficiency
<i>Cxcl1</i>	NM_008176	101 bp	TCTCCGTTACTTGGGGACAC	CCACACTCAAGAATGGTCGC	Yes	103%
<i>Cxcl2</i>	NM_009140	102 bp	AACATCCAGAGCTTGAGTGTGA	TTCAGGGTCAAGGCAAACCTT	Yes	100%
<i>Cxcl9</i>	NM_008599	107 bp	TAGGCAGGTTTGATCTCCGT	CGATCCACTACAAATCCCTCA	Yes	101%
<i>Cxcl10</i>	NM_021274	107 bp	CCTATGGCCCTCATCTCTCAC	CTCATCCTGCTGGGTCTGAG	Yes	97%
<i>Ccl3</i>	NM_011337	91 bp	GTGGAATCTTCCGGCTGTAG	ACCATGACACTCTGCAACCA	Yes	95%
<i>Ccl4</i>	NM_013652	109 bp	GAAACAGCAGGAAGTGGGAG	CATGAAGCTCTGCGTGTCTG	Yes	95%
<i>Ccl7</i>	NM_013654	91 bp	TTCTCTTGGGGATCTTTTG	CTGCTTTCAGCATCCAAGTG	Yes	94%
<i>Ifnβ</i>	NM_010510	109 bp	CCCAGTGCTGGAGAAATTGT	CCCTATGGAGATGACGGAGA	No	97%
<i>Ifnγ</i>	NM_008337	90 bp	TGAGCTCATTGAATGCTTGG	ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT	Yes	97%
<i>Il1β</i>	NM_008361	129 bp	AGGTCAAAGGTTTGGAAGCA	TGAAGCAGCTATGGCAACTG	Yes	101%
<i>Il6</i>	NM_031168	139 bp	ATGGATGCTACCAAACCTGGAT	TGAAGGACTCTGGCTTTGTCT	Yes	103%
<i>Irf1</i>	NM_008390	109 bp	AGGCATCCTTGTTGATGTCC	AATTCCAACCAAATCCCAGG	Yes	96%
<i>Irf7</i>	NM_016850	94 bp	AGCATTGCTGAGGCTCACTT	TGATCCGCATAAGGTGTACG	Yes	98%
<i>Tnf</i>	NM_013693	103 bp	AGGGTCTGGGCCATAGAACT	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	Yes	99%
<i>Actβ</i>	NM_007393	170 bp	CCAACCGTAAAAAGATGACC	AGCATAGCCCTCGTAGATG	Yes	98%
<i>B2m</i>	NM_009735	110 bp	ATGGCTCGCTCGGTGACCCT	TTCTCCGGTGGGTGGCGTGA	Yes	99%

Supplemental Table II. Genes up-regulated greater than three-fold in C57BL/6 mice infected with different *S. suis* strains (intermediate pathogenic North American, high pathogenic European, or epidemic Chinese) for 3 h.

Genebank ID	Gene	Gene description	North American	European	Chinese
<u>Cytokines, chemokines, and related receptors</u>					
NM_011333.3	<i>Ccl2</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 2, MCP-1	1.7	2.3	3.5
NM_011337.2	<i>Ccl3</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 3, MIP-1 α	4.0	15.8	21.7
NM_013652.2	<i>Ccl4</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 4, MIP-1 β	5.9	22.0	27.1
NM_013654.2	<i>Ccl7</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 7, MCP-3	1.7	2.8	3.9
NM_011330.2	<i>Ccl11</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 11, Eotaxin	1.5	3.6	3.8
NM_017466.4	<i>Ccr12</i>	Chemokine (C-C motif) receptor-like 2	2.7	4.7	5.4
NM_008176.1	<i>Cxcl1</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1, KC	7.0	23.2	27.3
NM_009140.2	<i>Cxcl2</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2, MIP-2 α	2.4	4.2	7.9
NM_021274.1	<i>Cxcl10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10, IP-10	4.1	3.6	3.4
NM_011819.1	<i>Gdf15</i>	Growth differentiation factor 15	2.9	4.7	4.9
NM_010554	<i>Il1a</i>	Interleukin 1 alpha	1.7	2.6	3.1
NM_008361	<i>Il1b</i>	Interleukin 1 beta	2.5	5.3	6.2
NM_031168.1	<i>Il6</i>	Interleukin 6	1.5	2.8	3.5
NM_013693.1	<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor	3.9	9.3	10.4
NM_009396.1	<i>Tnfaip2</i>	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein2	1.7	3.7	3.1
NM_009397.2	<i>Tnfaip3</i>	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein3	2.6	4.7	4.5
<u>Cytokine signaling</u>					
NM_031185.2	<i>Akap12</i>	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	3.1	8.1	7.1
NM_013642.2	<i>Dusp1</i>	Dual specificity	3.1	6.5	7.8

NM_010090.2	<i>Dusp2</i>	phosphatase 1 Dual specificity phosphatase 2	1.8	3.3	3.1
NM_007913.5	<i>Egr1</i>	Early growth response 1	1.9	2.6	3.3
NM_133753.1	<i>Errfi1</i>	ERBB receptor feedback inhibitor 1	4.8	8.5	7.7
NM_173398.2	<i>Gpr171</i>	G protein-coupled receptor 171	1.6	3.1	3.2
NM_133662.2	<i>Ier3</i>	Immediate early response 3	2.1	4.8	5.1
NM_015811.1	<i>Rgs1</i>	Regulator of G-protein signaling 1	3.4	6.7	6.2
NM_011267.2	<i>Rgs16</i>	Regulator of G-protein signaling 16	1.9	2.6	3.3
NM_001033335.2	<i>Serpina3f</i>	Serine peptidase inhibitor, clade A, member 3F	2.2	3.2	2.7
NM_007707.2	<i>Socs3</i>	Suppressor of cytokine signaling 3	2.5	5.1	5.3

Host defense

NM_033601.1	<i>Bcl3</i>	B-cell leukemia/lymphoma 3	2.0	3.1	2.3
NM_009841.3	<i>Cd14</i>	CD14 antigen	2.6	6.6	7.0
NM_011905.2	<i>Tlr2</i>	Toll-like receptor 2	2.0	3.1	2.9

Apoptosis, cell cycle regulation, and oncogenesis

NM_008655.1	<i>Gadd45b</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	1.7	3.7	3.7
NM_008654.1	<i>Myd116</i>	Myeloid differentiation primary response gene 116	2.1	3.9	4.4
NM_009344.1	<i>Phlda1</i>	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	2.0	3.2	3.5

Transcriptional and translational regulation

NM_009883.3	<i>Cebpb</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) β	2.8	4.2	4.1
NM_013498.1	<i>Crem</i>	cAMP responsive element modulator	1.6	2.8	3.4
NM_010234.2	<i>Fos</i>	FBJ osteosarcoma oncogene	2.9	5.1	6.8

NM_030887.2	<i>Jdp2</i>	Jun dimerization protein 2	2.4	2.9	3.1
NM_008416.1	<i>Junb</i>	Jun-B oncogene	2.4	4.1	4.2
NM_010907.1	<i>Nfkbia</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	2.3	3.5	3.9
NM_030612.2	<i>Nfkbiz</i>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	2.1	5.2	5.8
NM_011756.4	<i>Zfp36</i>	Tristetraprolin	2.0	3.2	3.2
<u>Fatty acid metabolism</u>					
NM_009890.1	<i>Ch25h</i>	Cholesterol 25-hydroxylase	2.9	4.1	4.6
NM_011636.1	<i>Plscr1</i>	Phospholipid scramblase 1	1.7	3.0	2.9
NM_011451.2	<i>Sphk1</i>	Sphingosine kinase 1, transcript variant 1	1.8	3.8	3.9
<u>Cell adhesion and migration</u>					
NM_172845.1	<i>Adamts4</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 4	2.1	4.8	5.8
<u>Surface receptor molecule and antigen presentation</u>					
NM_001033122.3	<i>Cd69</i>	CD69	2.5	3.5	2.8
NM_009856.1	<i>Cd83</i>	CD83	1.8	3.0	3.2
<u>Biological and metabolic process</u>					
NM_007669.3	<i>Cdkn1a</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	3.4	5.8	5.0
NM_008230.4	<i>Hdc</i>	Histidine decarboxylase	2.0	3.3	3.9
NM_153101.1	<i>Mrgpra2</i>	MAS-related GPR, member A2	1.7	3.1	3.1
NM_013614.1	<i>Odc1</i>	Ornithine decarboxylase, structural 1	1.8	3.5	3.8

Values represent mean fold increase in spleens of infected mice compared to mock-infected C57BL/6 mice ($n = 4$ mice per group).

Supplemental Table III. Genes down-regulated greater than three-fold in C57BL/6 mice infected with different *S. suis* strains (intermediate pathogenic North American, high pathogenic European, or epidemic Chinese) for 3 h.

Genebank ID	Gene	Gene description	North American	European	Chinese
Blood coagulation					
NM_028784.2	<i>F13a1</i>	Coagulation factor XIII, A1 subunit	3.5	3.1	3.8
Cytokine signaling					
NM_029811.2	<i>Asb2</i>	Ankyrin repeat and SOCS box-containing 2	1.9	3.0	3.0
NM_023049.1	<i>St5</i>	Suppression of tumorigenicity 5	1.7	3.1	2.7
Biological and metabolic process					
NM_009892.1	<i>Chi3l3</i>	Chitinase 3-like 3	1.7	2.6	3.0

Values represent mean fold decrease in spleens of infected mice compared to mock-infected C57BL/6 mice ($n = 4$ mice per group).

Supplemental Table IV. Genes up-regulated greater than three-fold in C57BL/6 mice infected with intermediate pathogenic North American, high pathogenic European, or epidemic Chinese strain of *S. suis* for 6 h.

Genebank ID	Gene	Gene description	North American	European	Chinese
<u>Cytokines, chemokines, and related receptors</u>					
NM_011333.3	<i>Ccl2</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 2, MCP-1	5.6	3.7	7.2
NM_011337.2	<i>Ccl3</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 3, MIP-1 α	24.4	28.5	46.7
NM_013652.2	<i>Ccl4</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 4, MIP-1 β	33.1	38.0	53.7
NM_013654.2	<i>Ccl7</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 7, MCP-3	4.6	3.8	11.7
NM_011330.2	<i>Ccl11</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 11, Eotaxin	4.6	8.5	12.4
NM_017466.4	<i>Ccr12</i>	Chemokine (C-C motif) receptor-like 2	7.4	5.7	10.7
NM_008176.1	<i>Cxcl1</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1, KC	12.3	19.8	35.4
NM_009140.2	<i>Cxcl2</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2, MIP-2 α	5.2	6.6	16.4
NM_008599.3	<i>Cxcl9</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9, MIG	5.4	2.9	5.6
NM_021274.1	<i>Cxcl10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10, IP-10	21.6	14.1	23.0
NM_011819.1	<i>Gdf15</i>	Growth differentiation factor 15	3.7	2.9	3.7
NM_008337.3	<i>Ifng</i>	Interferon gamma	3.6	2.7	10.9
NM_019440.2	<i>ligp2</i>	Interferon inducible GTPase 2	3.1	2.0	2.5
NM_010554	<i>Il1a</i>	Interleukin 1 alpha	3.0	3.0	4.6
NM_008361	<i>Il1b</i>	Interleukin 1 beta	2.9	2.5	4.3
NM_031167.3	<i>Il1rn</i>	Interleukin 1 receptor antagonist, transcript 1	3.6	7.1	9.1
NM_031168.1	<i>Il6</i>	Interleukin 6	2.8	2.2	6.0
NM_010548.1	<i>Il10</i>	Interleukin 10	1.8	2.6	3.9
NM_008357.1	<i>Il15</i>	Interleukin 15	3.3	1.1	2.4
NM_145636.1	<i>Il27</i>	Interleukin 27	3.7	1.2	3.9

NM_133775.1	<i>Il33</i>	Interleukin 33	1.7	2.1	3.2
NM_008694.1	<i>Ngp</i>	Neutrophilic granule protein	3.6	2.3	2.3
NM_013693.1	<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor	11.5	4.8	8.0
NM_009396.1	<i>Tnfaip2</i>	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	3.1	2.7	3.3
NM_009397.2	<i>Tnfaip3</i>	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	3.4	4.3	6.2
NM_011659.2	<i>Tnfrsf4</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	1.9	2.7	3.3

Cytokine signaling

NM_031185.2	<i>Akap12</i>	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	4.9	9.6	10.5
NM_016847.2	<i>Avpr1a</i>	Arginine vasopressin receptor 1A	2.7	2.9	3.7
NM_009895.3	<i>Cish</i>	Cytokine inducible SH2-containing protein	2.8	2.7	4.7
NM_013642.2	<i>Dusp1</i>	Dual specificity phosphatase 1	4.4	5.8	6.8
NM_130447.2	<i>Dusp16</i>	Dual specificity phosphatase 2	1.9	1.0	3.1
NM_010104.2	<i>Edn1</i>	Endothelin 1	2.4	4.1	5.1
NM_133753.1	<i>Errfi1</i>	ERBB receptor feedback inhibitor 1	5.2	7.3	8.2
NM_173398.2	<i>Gpr171</i>	G protein-coupled receptor 171	2.2	3.5	4.7
NM_133662.2	<i>Ier3</i>	Immediate early response 3	3.0	2.9	4.5
NM_008390.1	<i>Irf1</i>	Interferon regulatory factor 1	2.8	2.2	4.1
NM_016850.2	<i>Irf7</i>	Interferon regulatory factor 7	6.8	2.9	4.3
NM_181593.2	<i>Itpkc</i>	Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C	2.2	2.3	3.4
NM_008522.3	<i>Ltf</i>	Lactotransferrin	3.4	2.0	1.6
NM_007746.2	<i>Map3k8</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase 8	2.3	2.9	3.2
NM_172603.2	<i>Phf11</i>	PHD finger protein 11	5.2	2.6	3.4
NM_015811.1	<i>Rgs1</i>	Regulator of G-protein signaling 1	5.1	6.8	8.8
NM_011267.2	<i>Rgs16</i>	Regulator of G-	3.3	2.2	3.4

		protein signaling			
		16			
NM_001033335.2	<i>Serpina3f</i>	Serine peptidase inhibitor, clade A, member 3F	7.2	6.1	8.3
NM_007707.2	<i>Socs3</i>	Suppressor of cytokine signaling 3	3.3	4.9	6.0
NM_146162.1	<i>Tmem119</i>	Transmembrane protein 119	1.9	2.5	3.0
NM_172275.1	<i>Trafd1</i>	TRAF type zinc finger domain containing 1	3.3	2.0	2.8
NM_009099.2	<i>Trim30</i>	Tripartite motif-containing 30	3.1	2.1	2.7
NM_023137.2	<i>Ubd</i>	Ubiquitin D	4.0	3.0	5.2
Host defense					
NM_009841.3	<i>Cd14</i>	CD14	4.4	5.6	8.3
NM_013459.1	<i>Cfd</i>	Complement factor D (adipsin)	1.2	1.0	3.3
NM_010819.3	<i>Clec4d</i>	C-type lectin domain family 4, member d	1.9	2.4	3.3
NM_019948.2	<i>Clec4e</i>	C-type lectin domain family 4, member e	2.5	2.2	3.4
NM_030150.2	<i>Dhx58</i>	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	4.7	2.9	3.6
NM_144559.1	<i>Fcgr4</i>	Fc receptor, IgG, low affinity IV	2.6	2.8	3.3
NM_008332.2	<i>Ifit2</i>	IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	8.6	4.2	7.7
NM_010501.2	<i>Ifit3</i>	IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	8.1	5.4	6.4
NM_008330.1	<i>Ifi47</i>	Interferon gamma inducible protein 47	4.0	2.7	3.1
NM_008326.1	<i>Irgm1</i>	Immunity-related GTPase family M member 1	4.5	3.6	5.3
NM_020583.4	<i>Isg20</i>	Interferon-stimulated protein 20	5.2	2.0	3.3
NM_008491.1	<i>Lcn2</i>	Lipocalin 2	3.0	3.9	4.7
NM_010846.1	<i>Mx1</i>	Myxovirus (influenza virus) resistance 1	4.9	2.0	3.0
NM_013606	<i>Mx2</i>	Myxovirus (influenza virus) resistance 2	7.4	4.3	7.4
NM_026004.2	<i>Nt5c3</i>	5'-nucleotidase, cytosolic III	3.4	2.1	2.3
NM_011852.2	<i>Oas1g</i>	2'-5' oligoadenylatesynthetase 1G	4.8	2.4	3.0
NM_145227.1	<i>Oas2</i>	2'-5'	5.5	2.6	3.7

NM_145209.2	<i>Oas1</i>	oligoadenylatesy nthease 2 2'-5'	8.3	5.2	7.0
NM_011854.1	<i>Oas2</i>	oligoadenylatesy nthease-like 1 2'-5'	4.0	2.1	2.7
NM_008987.3	<i>Ptx3</i>	oligoadenylatesy nthease-like 2 Pentraxin related	2.6	1.4	4.7
NM_021384.3	<i>Rsad2</i>	gene Radical S- adenosyl methionine domain	8.4	5.8	8.3
NM_018851.2	<i>Samhd1</i>	containing 2 SAM domain and HD domain, 1	3.1	2.1	3.0
<u>Apoptosis, cell cycle regulation, and oncogenesis</u>					
NM_153287.3	<i>Axud1</i>	AXIN1 up- regulated 1	2.6	2.6	3.5
NM_207680.2	<i>Bcl2l11</i>	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator), transcript variant 1	1.6	2.9	3.2
NM_007829.3	<i>Daxx</i>	Fas death domain- associated protein	4.6	3.3	4.7
NM_010128.4	<i>Emp1</i>	Epithelial membrane protein 1	1.9	4.3	5.6
NM_011046.2	<i>Furin</i>	Furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)	1.5	2.2	3.6
NM_008655.1	<i>Gadd45b</i>	Growth arrest and DNA- damage- inducible 45 beta	3.4	3.2	3.4
NM_030701.1	<i>Gpr109a</i>	G protein- coupled receptor 109A	2.8	2.8	4.2
NM_010807.3	<i>Marcks1</i>	MARCKS-like 1	3.4	2.7	3.5
NM_008654.1	<i>Myd116</i>	Myeloid differentiation primary response gene 116	2.8	2.7	4.0
NM_009344.1	<i>Phlda1</i>	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	1.9	1.9	3.4
NM_152804.1	<i>Plk2</i>	Polo-like kinase 2	2.0	2.6	3.3
<u>Transcriptional and translational regulation</u>					
NM_028967.1	<i>Batf2</i>	Basic leucine zipper transcription	3.3	1.9	3.5

		factor, ATF-like 2			
NM_009883.3	<i>Cebpb</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	2.8	2.7	4.0
NM_013498.1	<i>Crem</i>	cAMP responsive element modulator	2.3	2.2	3.8
NM_199015.1	<i>D14ertd668e</i>	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 668, expressed	5.2	3.1	3.4
NM_011163.3	<i>Eif2ak2</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	4.5	3.1	3.3
NM_010234.2	<i>Fos</i>	FBJ osteosarcoma oncogene	4.0	2.6	4.6
NM_008416.1	<i>Junb</i>	Jun-B oncogene	2.4	2.7	3.9
NM_010907.1	<i>Nfkbia</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells	2.9	3.5	4.0
NM_030612.2	<i>Nfkbiz</i>	inhibitor, alpha nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells	4.3	4.2	5.2
NM_172893.2	<i>Parp12</i>	inhibitor, beta Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	3.1	1.7	2.3
NM_001039530.1	<i>Parp14</i>	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	4.0	3.1	3.9

Fatty acid metabolism

NM_009890.1	<i>Ch25h</i>	Cholesterol 25-hydroxylase	2.7	2.4	3.5
NM_011636.1	<i>Plscr1</i>	Phospholipid scramblase 1	1.9	2.9	3.0
NM_011315.3	<i>Saa3</i>	Serum amyloid A 3	4.2	3.7	6.6
NM_011451.2	<i>Sphk1</i>	Sphingosine kinase 1 (Sphk1), transcript variant 1	3.9	7.5	8.3

Cell adhesion and migration

NM_172845.1	<i>Adamts4</i>	ADAM metalloproteinase with	6.2	5.4	10.1
-------------	----------------	-----------------------------	------------	------------	-------------

NM_010708.1	<i>Lgals9</i>	thrombospondin type 1 motif, 4 lectin, galactose binding, soluble 9	3.0	2.1	2.7
NM_029005.1	<i>Mkl1</i>	Mixed lineage kinase domain-like	3.3	1.8	2.4
NM_008607.1	<i>Mmp13</i>	Matrix metalloproteinase 13	9.9	4.1	7.0
NM_008608.2	<i>Mmp14</i>	Matrix metalloproteinase 14	2.1	3.0	3.1
NM_010809.1	<i>Mmp3</i>	Matrix metalloproteinase 3	2.3	3.8	5.5
NM_008630.2	<i>Mt2</i>	Metallothionein 2	2.9	2.8	3.2
NM_011113.3	<i>Plaur</i>	Plasminogen activator, urokinase receptor	2.0	2.4	3.1
NM_011593.2	<i>Timp1</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1, transcript variant 2	3.0	6.0	8.3

Surface receptor molecule, antigen presentation and co-stimulation

NM_021893.2	<i>Cd274</i>	CD274	4.1	5.1	5.9
NM_001033122.3	<i>Cd69</i>	CD69	6.1	4.8	6.8
NM_007426.3	<i>Angpt2</i>	Angiopoietin 2	1.6	3.3	3.0
NM_010415.1	<i>Hbegf</i>	Heparin-binding EGF-like growth factor	2.1	2.5	3.9

Cytoskeleton/actin rearrangement

NM_007930.3	<i>Enc1</i>	Ectodermal-neural cortex 1	2.6	3.1	4.1
NM_007984.2	<i>Fscn1</i>	Fascin homolog 1, actin bundling protein	2.3	2.8	4.4
NM_026473.2	<i>Tubb6</i>	Tubulin, beta 6	1.6	2.6	3.1

Biological and metabolic process

NM_024495.4	<i>Car13</i>	Carbonic anhydrase 13	2.8	2.9	3.3
NM_007669.3	<i>Cdkn1a</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	5.4	6.7	10.2
NM_007695.2	<i>Chi3l1</i>	Chitinase 3-like 3	1.7	2.5	3.2
NM_010260.1	<i>Gbp2</i>	Guanylate binding protein 2	4.7	3.5	5.3
NM_018734.2	<i>Gbp3</i>	Guanylate binding protein 3	3.2	2.3	3.6
NM_153564.2	<i>Gbp5</i>	Guanylate binding protein 5	5.8	2.4	4.2
NM_145545.2	<i>Gbp6</i>	Guanylate	3.4	1.9	2.9

NM_008102.3	<i>Gch1</i>	binding protein 6 GTP	1.6	1.2	3.2
NM_008230.4	<i>Hdc</i>	cyclohydrolase 1 Histidine	3.7	2.7	3.4
NM_027320.4	<i>Ifi35</i>	decarboxylase interferon- induced protein 35	3.2	2.2	2.5
NM_018738.3	<i>Igtp</i>	Interferon gamma induced GTPase	3.9	3.2	4.2
NM_021342.1	<i>Kcne4</i>	Potassium voltage-gated channel, Isk- related subfamily, gene 4	2.2	2.0	3.1
NM_153101.1	<i>Mrgpra2</i>	MAS-related GPR, member A2	2.3	2.9	3.2
NM_026835.2	<i>Ms4a6d</i>	membrane- spanning 4- domains, subfamily A, member 6D	2.8	2.8	3.3
NM_013614.1	<i>Odc1</i>	ornithine decarboxylase, structural 1	2.6	4.3	4.7
NM_019511.3	<i>Ramp3</i>	Receptor (calcitonin) activity modifying protein 3	1.1	2.1	4.2
NM_011328.2	<i>Sct</i>	Secretin	4.2	1.2	1.4
NM_023044.1	<i>Slc15a3</i>	Solute carrier family 15, member 3	2.3	2.5	3.3
NM_011990.2	<i>Slc7a11</i>	Solute carrier family 7, member 11	1.9	3.4	4.2
NM_020557.3	<i>Tyki</i>	Cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2	6.7	2.9	4.0
NM_009477.1	<i>Upp1</i>	Uridinephosphor ylase 1	3.1	3.9	4.0
NM_011909.1	<i>Usp18</i>	Ubiquitin specific peptidase 18	10.3	6.0	8.1

Values represent mean fold increase in spleens of infected mice compared to mock-infected C57BL/6 mice ($n = 4$ mice per group).

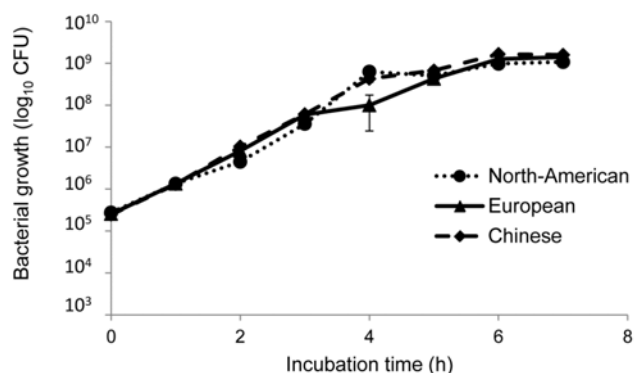
Supplemental Table 5. Genes down-regulated greater than three-fold in C57BL/6 mice infected with intermediate pathogenic North American, high pathogenic European, or epidemic Chinese strain of *S. suis* for 6 h.

Genebank ID	Gene	Gene description	North American	European	Chinese
<u>Apoptosis, cell cycle regulation, and oncogenesis</u>					
NM_024223.1	<i>Crip2</i>	Cysteine rich protein 2	2.6	3.4	4.2
NM_016974.1	<i>Dbp</i>	D site albumin promoter binding protein	2.1	2.8	3.5
NM_016917.2	<i>Slc40a1</i>	Solute carrier family 40, member 1	5.9	9.6	11.5
Blood coagulation NM_028784.2	<i>F13a1</i>	Coagulation factor XIII, A1 subunit	2.8	3.1	3.2
<u>Cytokine signaling</u>					
NM_023049.1	<i>Asb2</i>	Ankyrin repeat and SOCS box-containing 2	2.7	3.9	7.2
NM_178045.3	<i>Rassf4</i>	Ras association domain family member 4	1.4	2.5	3.2
NM_029811.2	<i>St5</i>	Suppression of tumorigenicity 5	1.9	3.5	3.9
<u>Host defense</u>					
NM_029465.2	<i>Clec4g</i>	C-type lectin domain family 4, member g	3.2	3.1	4.0
NM_053214.1	<i>Fcer2a</i>	Fc receptor, IgE, low affinity II, alpha polypeptide	2.8	2.5	3.4
NM_013517.1	<i>Myo1f</i>	Myosin IF	2.0	2.8	3.3
<u>Fatty acid metabolism</u>					
NM_008256.3	<i>Alox5ap</i>	Arachidonate 5-lipoxygenase activating protein	1.8	3.1	3.5
NM_009663.1	<i>Hmgcs2</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	2.5	4.8	6.9
<u>Biological and metabolic process</u>					
NM_146184.4	<i>B3gnt8</i>	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosam	1.3	2.4	3.3

		inyltransferase 8			
NM_021273.3	<i>Ckb</i>	Creatine kinase, brain	3.0	3.2	3.0
NM_021896.4	<i>Gucy1a3</i>	Guanylatecyclase 1, soluble, alpha 3	2.9	2.8	3.3
NM_175316.3	<i>Slco2b1</i>	Solute carrier organic anion transporter family, member 2b1	1.9	4.2	5.4
NM_011545.1	<i>Tcf21</i>	Transcription factor 21	3.3	3.1	3.5
NM_009369.1	<i>Tgfb1</i>	Transforming growth factor, beta induced	2.3	3.4	3.5

Values represent mean fold decrease in spleens of infected mice compared to mock-infected C57BL/6 mice ($n = 4$ mice per group).

SUPPLEMENTAL FIGURES



Supplemental Fig. 1. Growth curves of the intermediately pathogenic North American, the highly pathogenic European, and the epidemic Chinese strains of *S. suis*.

Bacterial growth of these three strains of *S. suis* in Todd-Hewitt broth (THB) culture medium were similar under normal laboratory conditions. Starting cultures were prepared by inoculating three colonies of *S. suis* into 10 ml of THB and incubating these cultures at 37°C with agitation. When OD reached 0.400, 100 µl was transferred into 10 ml of fresh THB and cultures were incubated at 37°C with agitation. At every time point, 100 µl of bacterial culture was taken, diluted to proper concentration in PBS and plated to determine bacteria viable counts of each strain of *S. suis*. Data represent mean values in CFU ± SEM of three independent experiments.

References

1. **Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M.** 2010. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol* **5**:371-391.
2. **Mai NT, Hoa NT, Nga TV, Linh le D, Chau TT, et al.** 2008. *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam. *Clin Infect Dis* **46**:659-667.
3. **Hui AC, Ng KC, Tong PY, Mok V, Chow KM, et al.** 2005. Bacterial meningitis in Hong Kong: 10-years' experience. *Clin Neurol Neurosurg* **107**:366-370.
4. **Kerdsin A, Dejsirilert S, Puangpatra P, Sripakdee S, Chumla K, et al.** 2011. Genotypic profile of *Streptococcus suis* serotype 2 and clinical features of infection in humans, Thailand. *Emerg Infect Dis* **17**:835-842.
5. **Gottschalk M, Segura M.** 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* **76**:259-272.
6. **Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, Schultz C.** 2009. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clin Infect Dis* **48**:617-625.
7. **Yu H, Jing H, Chen Z, Zheng H, Zhu X, et al.** 2006. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis* **12**:914-920.
8. **Henningham A, Barnett TC, Maamary PG, Walker MJ.** 2012. Pathogenesis of Group A streptococcal infections. *Discov Med* **13**:329-342.
9. **Tang J, Wang C, Feng Y, Yang W, Song H, et al.** 2006. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med* **3**:e151.
10. **Galina L, Vecht U, Wisselink HJ, Pijon C.** 1996. Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the presence of muraminidase-released protein and extracellular factor. *Can J Vet Res* **60**:72-74.
11. **Higgins R, Gottschalk M.** 2001. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 2000. *Can Vet J* **42**:223.
12. **Gottschalk M, Segura M, Xu J.** 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim Health Res Rev* **8**:29-45.
13. **Chang B, Wada A, Ikebe T, Ohnishi M, Mita K, et al.** 2006. Characteristics of *Streptococcus suis* isolated from patients in Japan. *Jpn J Infect Dis* **59**:397-399.
14. **King SJ, Leigh JA, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, et al.** 2002. Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *J Clin Microbiol* **40**:3671-3680.
15. **Ye C, Zhu X, Jing H, Du H, Segura M, et al.** 2006. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis* **12**:1203-1208.
16. **Ye C, Zheng H, Zhang J, Jing H, Wang L, et al.** 2009. Clinical, experimental, and genomic differences between intermediately pathogenic, highly pathogenic, and epidemic *Streptococcus suis*. *J Infect Dis* **199**:97-107.
17. **Holden MT, Hauser H, Sanders M, Ngo TH, Cherevach I, et al.** 2009. Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *PLoS One* **4**:e6072.
18. **Chen C, Tang J, Dong W, Wang C, Feng Y, et al.** 2007. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PLoS One* **2**:e315.
19. **Zheng X, Zheng H, Lan R, Ye C, Wang Y, et al.** 2011. Identification of genes and genomic islands correlated with high pathogenicity in *Streptococcus suis* using whole genome tiling microarrays. *PLoS One* **6**:e17987.

20. **Dominguez-Punaro MC, Segura M, Plante MM, Lacouture S, Rivest S, et al.** 2007. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* **179**:1842-1854.
21. **Dominguez-Punaro Mde L, Segura M, Radzioch D, Rivest S, Gottschalk M.** 2008. Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. *Infect Immun* **76**:3901-3910.
22. **Berthelot-Herault F, Gottschalk M, Morvan H, Kobisch M.** 2005. Dilemma of virulence of *Streptococcus suis*: Canadian isolate 89-1591 characterized as a virulent strain using a standardized experimental model in pigs. *Can J Vet Res* **69**:236-240.
23. **Vanier G, Fittipaldi N, Slater JD, de la Cruz Dominguez-Punaro M, Rycroft AN, et al.** 2009. New putative virulence factors of *Streptococcus suis* involved in invasion of porcine brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog* **46**:13-20.
24. **Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, et al.** 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55**:611-622.
25. **Lemire P, Houde M, Lecours MP, Fittipaldi N, Segura M.** 2012. Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells. *Microbes Infect* **14**:1064-1076.
26. **Zheng H, Ye C, Segura M, Gottschalk M, Xu J.** 2008. Mitogenic effect contributes to increased virulence of *Streptococcus suis* sequence type 7 to cause streptococcal toxic shock-like syndrome. *Clin Exp Immunol* **153**:385-391.
27. **Schwerk C, Adam R, Borkowski J, Schneider H, Klenk M, et al.** 2011. *In vitro* transcriptome analysis of porcine choroid plexus epithelial cells in response to *Streptococcus suis*: release of pro-inflammatory cytokines and chemokines. *Microbes Infect* **13**:953-962.
28. **Glauser MP.** 1996. The inflammatory cytokines. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock. *Drugs* **52** 9-17.
29. **Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, Nandi D.** 2010. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine* **50**:1-14.
30. **Kroger A, Koster M, Schroeder K, Hauser H, Mueller PP.** 2002. Activities of IRF-1. *J Interferon Cytokine Res* **22**:5-14.
31. **Jaruga B, Hong F, Kim WH, Gao B.** 2004. IFN-gamma/STAT1 acts as a proinflammatory signal in T cell-mediated hepatitis via induction of multiple chemokines and adhesion molecules: a critical role of IRF-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**:G1044-1052.
32. **Shultz DB, Rani MR, Fuller JD, Ransohoff RM, Stark GR.** 2009. Roles of IKK-beta, IRF1, and p65 in the activation of chemokine genes by interferon-gamma. *J Interferon Cytokine Res* **29**:817-824.
33. **Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Delano MJ, Weinstein JS, Cuenca AG, et al.** 2010. Type I interferon signaling in hematopoietic cells is required for survival in mouse polymicrobial sepsis by regulating CXCL10. *J Exp Med* **207**:319-326.
34. **Mahalingam S, Chaudhri G, Tan CL, John A, Foster PS, et al.** 2001. Transcription of the interferon gamma (IFN-gamma)-inducible chemokine Mig in IFN-gamma-deficient mice. *J Biol Chem* **276**:7568-7574.
35. **Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, et al.** 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**:772-777.
36. **Tilahun AY, Holz M, Wu TT, David CS, Rajagopalan G.** 2011. Interferon gamma-dependent intestinal pathology contributes to the lethality in bacterial superantigen-induced toxic shock syndrome. *PLoS One* **6**:e16764.

37. **Newman KC, Riley EM.** 2007. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol* **7**:279-291.
38. **Li H, Llera A, Malchiodi EL, Mariuzza RA.** 1999. The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annu Rev Immunol* **17**:435-466.
39. **Paillot R, Darby AC, Robinson C, Wright NL, Steward KF, et al.** 2010. Identification of three novel superantigen-encoding genes in *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *szeF*, *szeN*, and *szeP*. *Infect Immun* **78**:4817-4827.
40. **Paillot R, Robinson C, Steward K, Wright N, Jourdan T, et al.** 2010. Contribution of each of four Superantigens to *Streptococcus equi*-induced mitogenicity, gamma interferon synthesis, and immunity. *Infect Immun* **78**:1728-1739.
41. **Kohler J, Heumann D, Garotta G, LeRoy D, Bailat S, et al.** 1993. IFN-gamma involvement in the severity of gram-negative infections in mice. *J Immunol* **151**:916-921.
42. **Neish AS, Read MA, Thanos D, Pine R, Maniatis T, et al.** 1995. Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF-kappa B as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1. *Mol Cell Biol* **15**:2558-2569.
43. **Ohmori Y, Hamilton TA.** 1995. The interferon-stimulated response element and a kappa B site mediate synergistic induction of murine IP-10 gene transcription by IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* **154**:5235-5244.
44. **Ohmori Y, Schreiber RD, Hamilton TA.** 1997. Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* **272**:14899-14907.
45. **Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, et al.** 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* **331**:44-49.
46. **Emoto M, Miyamoto M, Yoshizawa I, Emoto Y, Schaible UE, et al.** 2002. Critical role of NK cells rather than V alpha 14(+)NKT cells in lipopolysaccharide-induced lethal shock in mice. *J Immunol* **169**:1426-1432.
47. **Varma TK, Lin CY, Toliver-Kinsky TE, Sherwood ER.** 2002. Endotoxin-induced gamma interferon production: contributing cell types and key regulatory factors. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**:530-543.
48. **Andaluz-Ojeda D, Iglesias V, Bobillo F, Almansa R, Rico L, et al.** 2011. Early natural killer cell counts in blood predict mortality in severe sepsis. *Crit Care* **15**:R243.
49. **Rijneveld AW, Lauw FN, Schultz MJ, Florquin S, Te Velde AA, et al.** 2002. The role of interferon-gamma in murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* **185**:91-97.
50. **Smith PL, Lombardi G, Foster GR.** 2005. Type I interferons and the innate immune response--more than just antiviral cytokines. *Mol Immunol* **42**:869-877.
51. **Platanias LC.** 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* **5**:375-386.
52. **Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, et al.** 1998. Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett* **441**:106-110.
53. **Farlik M, Rapp B, Marie I, Levy DE, Jamieson AM, et al.** 2012. Contribution of a TANK-binding kinase 1-interferon (IFN) regulatory factor 7 pathway to IFN-gamma-induced gene expression. *Mol Cell Biol* **32**:1032-1043.
54. **Remoli ME, Giacomini E, Lutfalla G, Dondi E, Orefici G, et al.** 2002. Selective expression of type I IFN genes in human dendritic cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **169**:366-374.

55. **Parker D, Martin FJ, Soong G, Harfenist BS, Aguilar JL, et al.** 2011. *Streptococcus pneumoniae* DNA initiates type I interferon signaling in the respiratory tract. *MBio* **2**:e00016-00011.
56. **Koppe U, Hogner K, Doehn JM, Muller HC, Witzentrath M, et al.** 2012. *Streptococcus pneumoniae* stimulates a STING- and IFN regulatory factor 3-dependent type I IFN production in macrophages, which regulates RANTES production in macrophages, cocultured alveolar epithelial cells, and mouse lungs. *J Immunol* **188**:811-817.
57. **Gratz N, Siller M, Schaljo B, Pirzada ZA, Gattermeier I, et al.** 2008. Group A *Streptococcus* activates type I interferon production and MyD88-dependent signaling without involvement of TLR2, TLR4, and TLR9. *J Biol Chem* **283**:19879-19887.
58. **Xiao N, Eidenschenk C, Krebs P, Brandl K, Blasius AL, et al.** 2009. The Tpl2 mutation Sluggish impairs type I IFN production and increases susceptibility to Group B streptococcal disease. *J Immunol* **183**:7975-7983.
59. **Mancuso G, Midiri A, Biondo C, Beninati C, Zummo S, et al.** 2007. Type I IFN signaling is crucial for host resistance against different species of pathogenic bacteria. *J Immunol* **178**:3126-3133.
60. **O'Connell RM, Saha SK, Vaidya SA, Bruhn KW, Miranda GA, et al.** 2004. Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* **200**:437-445.
61. **Kuchtey J, Fulton SA, Reba SM, Harding CV, Boom WH.** 2006. Interferon- α mediates partial control of early pulmonary *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection. *Immunology* **118**:39-49.
62. **Martin FJ, Gomez MI, Wetzel DM, Memmi G, O'Seaghdha M, et al.** 2009. *Staphylococcus aureus* activates type I IFN signaling in mice and humans through the Xr repeated sequences of protein A. *J Clin Invest* **119**:1931-1939.

ANNEXE IV, ARTICLE X**"Group B *Streptococcus* induces a robust IFN- γ response by CD4⁺ T cells in an *in vitro* and *in vivo* model"**

Damian Clarke, Marie-Pier Lecours, Paul Lemire, Tristan Galbas, Jacques Thibodeau and Mariela Segura.

Soumis dans: *Infect Immun.* **2014** (manuscript number: IA101587-14).

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

J'ai participé aux expériences *in vivo* de l'article, plus spécifiquement à la standardisation des infections *in vivo* et à la révision de l'article.

Group B *Streptococcus* induces a robust IFN- γ response by CD4⁺ T cells in an *in vitro* and *in vivo* model

Damian Clarke¹, Marie-Pier Lecours¹, Paul Lemire¹, Tristan Galbas², Jacques Thibodeau² and Mariela Segura^{1*}.

¹Laboratory of Immunology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada; ²Laboratory of Molecular Immunology, Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title: GBS-infection drives IFN- γ production by CD4⁺ T cells

Keywords: Group B *Streptococcus*; Interferon-gamma; T cells; dendritic cells, capsular polysaccharide

* Corresponding author. Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada. Tel.: +1 450 773 8521, ext. 0080; fax: +1 450 778 8108.

Abstract

Group B *Streptococcus* (GBS) serotype III is an important agent of life-threatening invasive infections and meningitis. Over the years, cytokines have emerged as important players for the control of disease, in particular IFN- γ . Although potential sources of this cytokine have been proposed, no specific cell line has ever been described as specific contributor. In this study, *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* approaches were developed to evaluate CD4⁺ T cell activation profiles in response to GBS. Results showed that total splenocytes readily produce a type 1 pro-inflammatory response by releasing IFN- γ , TNF- α and IL-6. Splenocytes also actively recruit T cells by producing chemokines such as CXCL9, CXCL10, and CCL3. Specifically, responding CD4⁺ T cells differentiate into Th1 cells producing large amounts of IFN- γ and TNF- α , as well as IL-2. The effect of GBS capsular polysaccharide (CPS), considered one of the major bacterial virulence factors, on T cell activation was evaluated *in vitro* using co-cultures of dendritic cells and isolated splenic CD4⁺ T cells infected either with wild-type GBS or a non-encapsulated mutant. Results suggest that GBS CPS differentially modulates IFN- γ production by CD4⁺ T cells and surface expression of CD69. Globally, our results further highlight the importance of IFN- γ for the control of GBS infection, which is produced by responding CD4⁺ T cells.

Abbreviations

APC	allophycocyanin	IC	intracellular
CCL	chemokine ligand	IFN	interferon
CFU	Colony-forming unit	IL	interleukin
ConA	concanavalin A	I.P.	intraperitoneal
CM	chloramphenicol	MACS	magnetic-activated cell sorting
CPS	capsular polysaccharide	MHC	major histocompatibility complex
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand	MOI	multiplicity of infection
CXCR	CXC chemokine receptor	PE	phycoerythrin
DC	dendritic cell	PE-Cy7	phycoerythrin-cyanine 7
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	NK	natural killer
FACS	fluorescence-activated cell sorting	NKT	natural killer t
FITC	fluorescein isothiocyanate	Th	T helper
GBS	Group B <i>Streptococcus</i>	TNF	tumor necrosis factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor	WT	wild-type

Introduction

Group B *Streptococcus* (GBS) or *Streptococcus agalactiae* is the main cause of life-threatening invasive infections in pregnant women and newborns worldwide (1, 2). GBS is also becoming increasingly associated with invasive disease in non-pregnant adults, in particular the elderly and individuals with underlying chronic illnesses (3). Clinical manifestations of GBS infection are mainly associated with the development of pneumonia, septicemia and meningitis. Type III GBS is one of the three major capsular types associated with invasive neonatal infection and is the most common type in GBS meningitis (1, 2). Cytokines appear to play a particularly important role for the control of disease, although exaggerated responses have also been described as potentially dangerous (4, 5). For instance, TNF- α has been demonstrated to be an important agent in driving GBS-induced sepsis (6, 7). In contrast, other cytokines have been shown to mediate beneficial effects, such as IL-10, IL-12, and IL-18 (6, 8-10)

In particular, IFN- γ has gained much interest over the years for its important beneficial role in controlling GBS infections. In fact, it was shown that IL-12 and IL-18 mediate their therapeutic effects by increasing IFN- γ production by responding immune cells (8-10). Furthermore, IFN- γ production is severely impaired during early life and might partly explain the susceptibility of neonates to GBS infection (8, 11, 12). Although certain immune cells have been proposed to secrete IFN- γ in response to GBS, such as NK and NKT cells (13, 14), no specific cell line has been clearly identified as source of this particular cytokine *in vivo* during GBS infection.

Activated CD4⁺ T cells can differentiate into different types of T helper (Th) cells depending on the signals received from their environment. Th1 CD4⁺ T cells readily produce IFN- γ upon activation and could therefore represent an interesting potential source of this cytokine during the development of GBS infection. Some evidence already shows that GBS induces a pro-inflammatory response that could potentially and ultimately lead to activation of T cells and production of IFN- γ . For example, GBS-infected dendritic cells (DCs) have been shown to produce large amounts of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and IL-12 (15). Furthermore, GBS-activated DCs also produce and release chemokines involved in T cell recruitment, such as CXCL9 and CXCL10 (15). Although these evidences strongly suggest a potential involvement of T cells in the production of

IFN- γ (16, 17), the specific participation of CD4⁺ T cells in the immuno-pathogenesis of GBS-induced disease has yet to be evaluated.

As aforementioned, GBS is a well-encapsulated bacterium that possesses a thick capsular polysaccharide (CPS) shell. The structure of type III GBS CPS is formed by the monosaccharides glucose, galactose and *N*-acetylglucosamine into a unique repeating unit that contains a side chain terminated by sialic acid α 2,3 linked to galactose (18). The sialylated CPS is recognized as the most important factor for GBS survival within the host and has been suggested to inhibit the activation of the alternative complement pathway and to impair the bactericidal functions of neutrophils (4, 19, 20). Experiments using mouse-derived DCs infected with either encapsulated GBS type III or a non-encapsulated isogenic mutant showed that encapsulated GBS is highly internalized by DCs, but survives better inside these cells than its non-encapsulated counterpart. Furthermore, the bacterial CPS selectively drives GBS internalization via specific endocytic pathways which cannot be engaged by the non-encapsulated bacteria (15, 21). It has been hypothesized that the route of entry might provide GBS a mechanism for the avoidance of intracellular degrading mechanisms (15, 22). Bacterial internalization and the presence of CPS were also related to modulation of several cytokine and chemokine release by GBS-infected DCs (15, 21, 23).

Based on these observations and previous findings on GBS interactions with DCs, the hypothesis of this study is that GBS drives CD4⁺ T cells to differentiate into IFN- γ producing Th1 cells and, that the bacterial CPS has the potential to modify this response. To this aim, we investigated the role of CD4⁺ T cells in the development of an immune response against GBS type III using an *in vivo* mouse model as well as *ex vivo* and *in vitro* experimental approaches. A non-encapsulated GBS mutant was included to dissect the role of this important virulence factor in T cell activation.

Material and methods

Bacterial strains and growth conditions

Strain COH-1, a highly encapsulated type III GBS isolate extensively described (15, 21, 22), was used in this study as the wild-type (WT) strain. An isogenic non-encapsulated (Δ *cpsE*) mutant, constructed and characterized in our previous work was also included (15,

21). GBS strains were grown on blood agar plates at 37°C for 18 h. Isolated colonies were inoculated in 5 ml of Todd–Hewitt Broth (THB; Becton Dickinson) and incubated for 8 h at 37°C with shaking. Working cultures were prepared by transferring 10 µl of 1/1,000 dilutions of 8 h-cultures into 30 ml of THB, which was incubated with shaking for an additional 12 h. Bacteria were washed twice with PBS pH 7.3 before being appropriately diluted in fresh medium to desired inoculum concentrations. The number of CFU/ml in the final suspension was determined by plating serial dilutions of working cultures on blood agar before enumerating individual colonies after overnight incubation at 37°C.

Mice and experimental infections

C57BL/6 female mice 5-week-old (Charles River Laboratories) were acclimatized to standard laboratory conditions of a 12 h-light/12 h-dark cycle with unlimited access to water and rodent chow. All experiments involving mice were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the Animal Welfare Committee of the University of Montréal. On the day of the experiment, a 0.5 ml volume of either the bacterial suspension (see below for selected doses) or the vehicle solution (sterile THB) was administered by intraperitoneal injection (i.p.). Mice were closely monitored daily to record mortality and clinical signs of disease, such as depression, rough appearance of hair coat and swollen eyes (24). Mice exhibiting extreme lethargy were considered moribund and were humanely euthanized. To determine the level of infection, numbers of viable bacteria in blood were quantified at different times post-infection. Blood (5 µl) was collected from the tail vein, serially diluted in PBS and plated using an Automated Spiral Plater (Spiral Biotech). Blood agar plates were incubated overnight at 37°C. Colonies were counted and data expressed as CFU/ml.

Generation of bone marrow-derived dendritic cells

Cells were generated from naïve C57BL/6 mice as previously described (15). Briefly, after red blood cell lysis, total bone marrow cells (2.5×10^5 cells/ml) were cultured in complete medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 20 µg/ml gentamycin, 100 U/ml penicillin-streptomycin, 2 mM L-glutamine and 50 µM 2-mercaptoethanol. All reagents were from Gibco (Invitrogen).

Complete medium was complemented with 20% GM-CSF from a mouse GM-CSF transfected cell line (Ag8653). Cells were cultured for 7 days at 37 °C with 5% CO₂. On day 7, clusters were harvested and subcultured overnight to remove adherent cells. Non-adherent cells were collected on day 8 and used as antigen-presenting cells for the studies. Cell purity was routinely 86-90% CD11c^{high} and F4/80^{-dim} cells as determined by FACS analysis and as previously reported (15).

Isolation of splenic CD4⁺ T cells

Untouched CD4⁺ T cells were purified from the spleen of either naïve or infected C57BL/6 mice by negative selection using CD4⁺ T cell isolation kit II according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Briefly, spleens were harvested from naïve or infected mice at the indicated times (see below) and perfused with RPMI complete medium (without antibiotics), teased apart, and pressed gently through a sterile fine wire mesh. The red blood cells were removed by incubation with NH₄Cl lysis buffer (eBioscience). To obtain CD4⁺ T cells, splenocytes were suspended in sterile PBS containing 2 mM EDTA and separated using Lympholyte-M density gradient (Cedarlane Lab.). Low-density cells at the interphase were collected and further purified by magnetic-activated cell sorting (MACS) negative selection as mentioned above. The enriched CD4⁺ T cells had > 96% purity as determined by FACS using anti-CD3 and anti-CD4 staining (data not shown).

In vivo infection model

For survival curves and selection of the infectious dose, C57BL/6 mice (n = 16) were injected i.p. with either 1 x 10⁶, 1 x 10⁷ or 1 x 10⁸ CFU of GBS strain COH-1 and clinical signs monitored daily as described above. Based on the obtained data (see Fig. 1A), for *in vivo* CD4⁺ T cell analysis, mice were injected i.p. with 1 x 10⁶ CFU. Surviving animals who had previously displayed clinical symptoms were boosted with a second dose of 1 x 10⁶ CFU of GBS strain COH-1 two weeks after initial infection. Bacteremia was monitored during the first 72 h post-primary infection or the first 24 h post-boost infection. Spleens of animals with clinical symptoms and positive bacteremia were harvested 96 h post-primary infection or 48 h post-boost infection (n = 2 per group x 5 individual experimental infections). Before harvesting, mice were injected i.p. with 500 µl of 200 µg of Brefeldin A solution in PBS (eBiosciences) 5 h prior to spleen collection. Control (placebo) animals were similarly

treated. Spleen CD4⁺ T cells were purified as described above, in the presence of Brefeldin A solution during all the purification steps. The selected time-points are based in pre-trials analysis using different post-infection times (data not shown). Purified CD4⁺ T cells were analyzed for cytokine production by intracellular staining followed by flow cytometry analysis (IC-FACS, see below).

Ex vivo analysis of total splenocytes

C57BL/6 mice were injected i.p with a dose of 1×10^7 CFU of GBS strain COH-1. Control mice were injected with the vehicle solution (sterile THB) (n = 3 per group x 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h post-infection, perfused with RPMI complete medium (without antibiotics), teased apart, and pressed gently through a sterile fine wire mesh. After red blood cells lysis and washing, total splenocytes were counted and plated at a concentration of 5×10^6 cells/ml in RPMI complete medium without antibiotics in 24-well flat bottom plates, and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 48 h and 72 h. However, after the initial 4 h of *ex-vivo* incubation, chloramphenicol (CM, 12 µg/ml, Sigma-Aldrich) was added to the culture to prevent cell toxicity. CM is a bacteriostatic agent, keeping a low and controlled level of bacteria through the incubation period as previously reported (15). Total splenocytes from control (placebo) animals were similarly treated. Concanavalin A (ConA, 0.1 µg/ml, Sigma-Aldrich) was used as positive control. Supernatants were harvested at the indicated time points for cytokine analysis by ELISA. In selected experiments, total splenocytes were incubated *ex-vivo* for 48 h as described above. However, brefeldin A (3 µg/ml) was added during the last 5 h, and either total splenocytes or CD4⁺ T cells (MACS-isolated from the culture wells) were analyzed by IC-FACS (see below). The above described final culture conditions for *ex vivo* analysis were selected based on multiple pre-trials using different post-infection times (6 h and 12 h) combined with 14, 24, 48 and 72 h *ex-vivo* incubation times (data not shown).

In vitro DC-T cell co-culture model

For the co-culture model, 1×10^5 DCs were plated in 48-well flat bottom plates for 1 h at 37°C with 5% CO₂. Afterwards, 1×10^5 CFU of either WT COH-1 strain or $\Delta cpsE$ mutant strain (MOI:1) were added to wells for 1 h. Extracellular bacteria were killed using 100 µg/ml of gentamycin and 5 µg/ml of penicillin G (Sigma-Aldrich) as previously described (15). After

1 h of antibiotic treatment and 3 washing steps, 5×10^5 freshly isolated CD4⁺ T cells from naïve mice (T cell: DC ratio of 5:1) were added to the wells. Co-cultures incubated with medium alone or ConA (0.1 µg/ml) served as negative and positive controls, respectively. For FACS analysis of surface marker expression, co-culture plates were incubated for 8 h and 24 h at 37°C, 5% CO₂, prior to cell harvesting and FACS analysis. For T cell cytokine expression, co-culture plates were incubated for 48 h, then centrifuged and replenished with fresh medium containing 10 ng/ml of mouse rIL-2 (Miltenyi Biotec). Plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 3 days allowing a resting period for activated T cells. After 3 days, T cells were harvested, washed, and seeded into 96 well flat-bottom culture plates coated with 5 µg/ml of anti-mouse-CD3 mAb (BD PharMingen) at a final concentration of 1×10^5 cells/well. These plates were incubated for 48 h at 37°C, 5% CO₂ prior to supernatant harvesting for ELISA testing. Single cell cultures (either DC alone or T cell alone) were also included as controls. No significant cytokine production was observed in single cell cultures under this protocol conditions (data not shown).

Cytokine quantification by ELISA

Levels of IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF-α, CCL3 (MIP-1α), CXCL9 (MIG), and CXCL10 (IP-10) in cell culture supernatants were measured by sandwich ELISA using pair-matched antibodies from R&D Systems or eBioscience, according to the manufacturer's recommendations. Twofold dilutions of recombinant mouse cytokines were used to generate standard curves. Sample dilutions giving OD readings in the linear portion of the appropriate standard curve were used to quantify the levels of each cytokine. The results are from at least three independent ELISA measurements.

FACS analysis

For cell surface staining of *in vitro* co-cultures, 10^6 cells were washed and treated for 15 min on ice with FcR-blocking reagent (FcγIII/II R_c Ab) in sorting buffer (PBS-1% fetal bovine serum). Blocked cells were then incubated with FITC-conjugated anti-mouse CD4 mAb (clone GK1.5) for 30 min on ice followed by washing and staining for 30 min with PE-conjugated anti-mouse CD69 mAb (clone H1.2F3). FACS was performed using a Cell Lab QuantaTM SC MPL MultiPlate Loader instrument (Beckman Coulter). Twenty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using Cell Lab Quanta

Collection/Analysis software. Quadrants were drawn based on FITC- and PE-control stains and were plotted on logarithmic scales.

For IC-FACS of MACS-purified CD4⁺ T cells from *in vivo* or *ex-vivo* experiments, cells were blocked as described above followed by fixation and permeabilization using IC Fixation/Permeabilization eBioscience kit as per the manufacture's recommendation. Permeabilized cells were then stained for 20 min at room temperature with PE-conjugated mAbs (eBioscience) directed against the following intracellular molecules: IFN- γ (clone XMG1.2), TNF- α (clone MP6-XT22), and IL-2 (clone JES6-5H4). FACS was performed using a FACSCalibur instrument (BD Biosciences). Twenty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using CellQuest software. Histograms were drawn based on PE-control stain and were plotted on logarithmic scales.

For multi-parametric IC-FACS of total splenocytes, cells were washed and blocked as described above followed by surface staining with PE-conjugated anti-CD19 (clone 6D5), PE-Cy7-conjugated anti-NK-1.1 (clone PK136), FITC-conjugated anti-CD3 (clone 17A2) and/or PE-conjugated CD69 (clone H1.2F3, BD Pharmingen) for 30 min on ice. Following fixation and permeabilization, intracellular staining was performed with APC-conjugated anti-IFN- γ (clone XMG1.2) or APC-conjugated anti-TNF- α (clone MP6-XT22) for 45 min at room temperature. Unless otherwise specified, all mAbs were from Biolegend. FACS was performed using a FACSCanto II instrument (BD Biosciences). Fifty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using FACSDiva™ software. Fluorescence Minus One (FMO) control staining was performed for proper analysis and gating of target cells.

Statistical analysis

Survival curves of infected mice were generated using Kaplan-Meier plots. Log-rank (Mantel-Cox) tests were used to compare the survival curves of the different studied groups. Values for bacterial loads in blood were compared using the Mann-Whitney test. Cytokine data are expressed as mean \pm SEM and analyzed for significance using Student's unpaired *t*-test. All analyses were performed using the Sigma Plot System (v.9; Systat Software). A *P* < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

Survival of GBS-infected C57BL/6 mice is dose-dependent

C57BL/6 mice were injected i.p. with GBS COH-1 strain at 3 different infectious doses: 1×10^6 , 1×10^7 , and 1×10^8 CFU. At 18 h post-infection, mice infected with 10^7 CFU or 10^8 CFU doses resulted in 75% and 69% mortality ($P > 0.05$), respectively (Fig. 1A). Mouse mortality continued to increase until 24 h post-infection to 82% and 94% ($P > 0.05$), respectively, and was maintained until 60 h post-infection when the experiment was terminated. Mice infected with a dose of 10^6 CFU were significantly less prone to mortality as compared to mice from the other two groups ($P < 0.05$) (Fig. 1A). Mortality continued to increase at 24 h and 36 h post-infection, yet remained significantly lower than mice infected with higher doses ($P < 0.05$). Indeed, groups of mice infected with 10^7 or 10^8 CFU doses quickly manifested intense clinical signs such as tousled hair, prostration, depression, and lethargy as early as 8 h post-infection. In mice infected with 10^6 CFU, appearance of clinical symptoms was delayed, usually to 12 h post-infection, and the observed clinical manifestations were less severe.

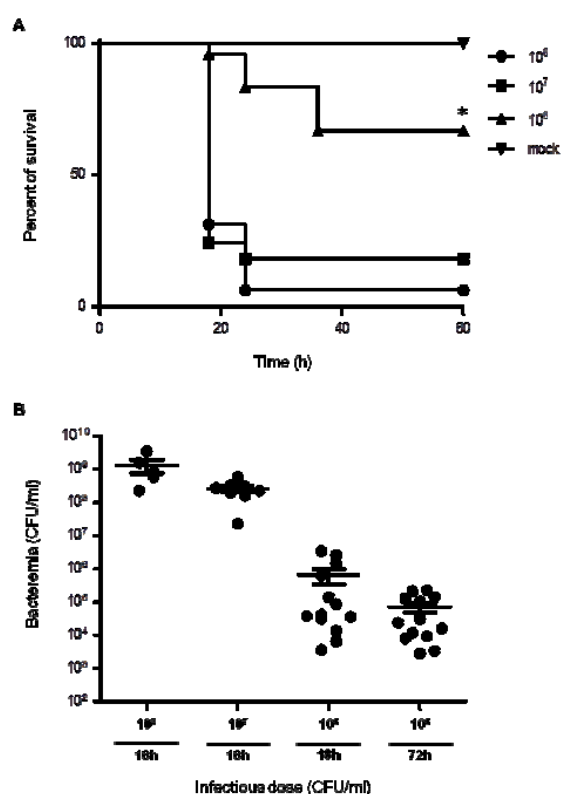


Fig. 1. Survival curves and bacteremia levels of GBS-infected C57BL/6 mice.

(A) Mice (n =16) were injected intra-peritoneally with different doses of wild-type GBS serotype III strain COH-1 and survival levels recorded. Mock-infected animal (injected with the vehicle solution) were used as controls. (B) Systemic bacteremia levels of infected mice was monitored at 18 h post-infection (for mice infected with 10^6 , 10^7 and 10^8 infectious doses) and at 72 h post-infection (for mice infected with 10^6 infectious dose). Blood was drawn by tail puncture and

serially diluted in PBS prior to plating on blood agar dishes. Individual colonies were counted and data expressed as CFU/ml of blood. * $P < 0.05$, compared to higher infectious doses.

Bacteremia of infected mice was also evaluated. Infection of C57BL/6 mice with GBS COH-1 strain induced strong bacteremia. In agreement to survival curves, bacteremia was very high in groups of mice infected with 10^7 or 10^8 CFU at 18 h post-infection and reached an average of 2.6×10^8 CFU/ml and 1.3×10^9 CFU/ml, respectively (Fig. 1B). In contrast, groups of mice infected with a dose of 10^6 CFU showed significantly lower bacteremia and reached an average of 5.7×10^5 CFU/ml at 18 h post-infection (Fig. 1B). Due to high levels of mortality, bacteremia levels could not be followed through time in mice infected with high bacterial doses. However, in mice infected with 10^6 CFU, bacteremia slowly decreased, reaching an average of 7.2×10^4 CFU/ml at 72 h post-infection (Fig. 1B).

Splenocytes produce type-1 pro-inflammatory cytokines in response to encapsulated GBS infection

Before understanding T cell activation in response to GBS, we were interested in characterizing the immunological environment produced by total splenocytes. To this aim we used the *ex vivo* approach where total splenocytes from mice infected with encapsulated GBS strain were incubated in culture plates for 48 h and 72 h. Supernatants were then collected and levels of cytokines and chemokines were measured (Fig. 2). Splenocytes from control (placebo) animals were used as negative controls and ConA-treated splenocytes were used as positive controls. ELISA tests revealed the presence of high amounts of IFN- γ , TNF- α and IL-6, suggesting the progression of a type-1 pro-inflammatory response. In agreement with its role in maintaining homeostasis, IL-10 was also unregulated in infected spleens (Fig. 2). No significant differences were observed in the levels of these cytokines between 48 h and 72 h of incubation. In addition to cytokines, it is well known that spleen cells produce chemokines for the recruitment of immune cells, such as T cells. Supernatants tested by ELISA revealed the presence of three important chemokines known to recruit T cells: CXCL9, CXCL10 and CCL3 (Fig. 2). Noteworthy, CXCL9 and CXCL10 are mainly released in response to IFN- γ activation (25), and thus, in agreement to the observed high levels of IFN- γ produced by GBS-infected splenocytes. Kinetics of chemokine production was similar to that of aforementioned cytokines, with the exception of CXCL9, which maximal production was delayed to 72 h of incubation.

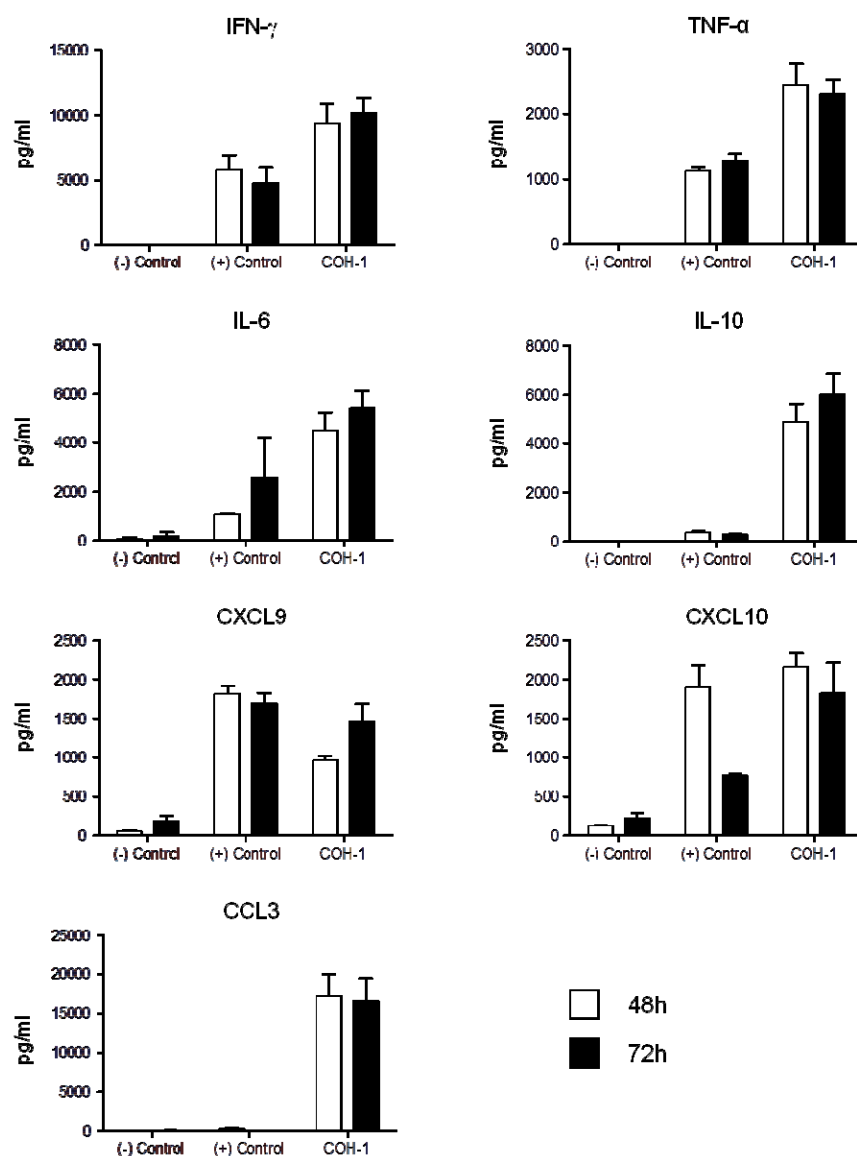


Fig. 2. *Ex vivo* cytokine and chemokine production profile by total splenocytes.

C57BL/6 mice were injected intra-peritoneally with a dose of 10^7 CFU of wild-type GBS serotype III strain COH-1 ($n = 3$ per group \times 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h post-infection and total splenocytes plated at 5×10^6 cells/well. After 4 h of incubation, the bacteriostatic agent chloramphenicol (12 μ g/ml) was added to the culture to prevent cell toxicity. Cells were then incubated for 48 h and 72 h and supernatants were collected for cytokine analysis by ELISA. Non-stimulated cells from mock-infected animals served as negative (-) control for basal expression. Cells stimulated with Concanavalin A (0.1 μ g/ml) were used as positive (+) control. Data are expressed as means \pm SEM (in pg/ml) from 3 different experiments.

Activated CD4⁺ T cells contribute to IFN- γ production during encapsulated GBS infection

With current understanding of the splenic environment produced in response to GBS, we were interested in determining the contribution of activated T cells in the production of cytokines. Firstly, we performed a multi-parametric FACS analysis of IFN- γ production by total splenocytes. As shown in Fig. 3A, CD3⁺ T cells markedly contributed to the IFN- γ response in the spleen of infected mice. NKT cells (NK1.1⁺ CD3⁺) produced low to negligible levels of IFN- γ (data not shown). NK cells (NK1.1⁺) were the major contributors to IFN- γ production within the CD3⁻ population (data not shown). As expected, CD19⁺ cells (B cells) did not produce significant levels of this cytokine (data not shown). Activated CD3⁺ T cells also contributed to approximately half the production of TNF- α by splenic cells (Fig. 3C). Compared to control mice, splenocytes from infected animals showed a significant increase in surface expression of the early activation marker CD69. High expression of this marker was also observed within the CD3⁺ population (Fig. 3B).

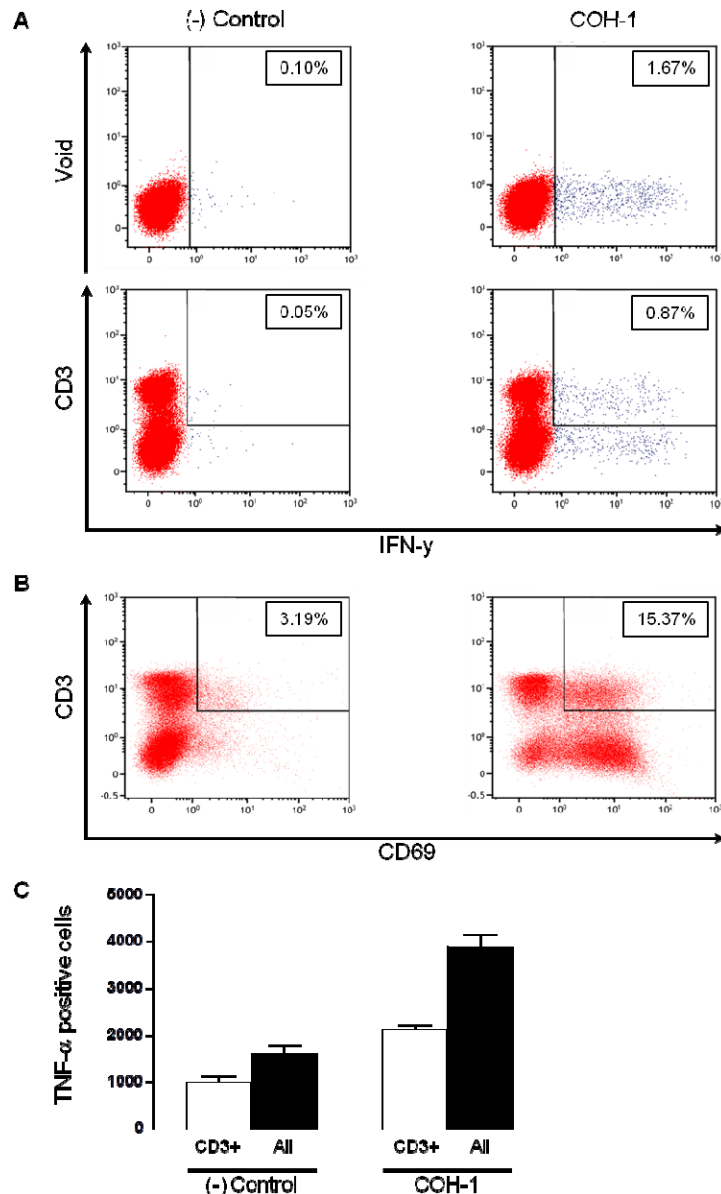
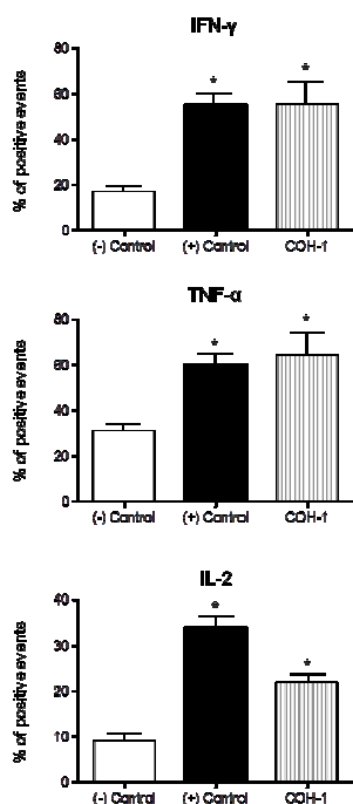


Fig. 3. Ex vivo analyses of cellular sources of IFN- γ during GBS infection.

C57BL/6 mice were injected intra-peritoneally with a dose of 10^7 CFU of wild-type GBS serotype III strain COH-1 (n = 3 per group x 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h post-infection and total splenocytes plated at 5×10^6 cells/well. After 4 h of incubation, the bacteriostatic agent chloramphenicol (12 μ g/ml) was added to the culture to prevent cell toxicity. Non-stimulated cells from mock-infected animals served as negative (-) control for basal expression. Total splenocytes were incubated for 48 h with brefeldin A (3 μ g/ml) added during the last 5 h of incubation. Cells were harvested and intracellularly stained for IFN- γ (A) or surface stained for CD69 (B) in combination with several surface markers for multi-parametric FACS analysis. Representative data from 3 different experimental infections based on CD3+ population or total splenic population (Void). (C) Number of TNF- α + cells within the CD3+ population or total splenic population (All). Data are expressed as means \pm SEM from 3 different experimental infections.



To specifically evaluate the role of CD4+ T cells during GBS infection, these target cells were isolated from ex-vivo total splenocyte cultures and analyzed by IC-FACS (Fig. 4). Experiments showed that activated CD4+ T cells readily contributed to the production of IFN- γ and TNF- α . Low levels of intracellular IL-2 were also observed. These data suggest that CD4+ T cells differentiate into Th1 type T cells and further support initial findings of the development of a type-1 pro-inflammatory immune response.

Fig. 4. Ex vivo analyses of CD4+ T cell contribution to cytokine production.

C57BL/6 mice were injected intra-peritoneally with a dose of 10^7 CFU of wild-type GBS serotype III strain COH-1 (n = 3 per group x 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h post-infection and total splenocytes plated at 5×10^6 cells/well. After 4 h of incubation, the

bacteriostatic agent chloramphenicol (12 µg/ml) was added to the culture to prevent cell toxicity. Non-stimulated cells from mock-infected animals served as negative (-) control for basal expression. Cells stimulated with Concanavalin A (0.1 µg/ml) were used as positive (+) control. Total splenocytes were incubated for 48 h. Brefeldin A (3 µg/ml) was added during the last 5 h of incubation and CD4⁺ T cells were MACS-isolated from the culture, stained intracellularly for different cytokines and analyzed by FACS. Data are expressed as mean ± SEM (in % of positive cells) from 3 individual experimental infections. **P* < 0.05, indicates statistically significant difference compared to (-) control cells.

These results were further confirmed using an *in vivo* model of infection. Results obtained from CD4⁺ T cells isolated from the spleen of infected mice 96 h post-primary infection showed that CD4⁺ T cells contribute to the production of IFN-γ and TNF-α. Intracellular levels of IL-2 were hardly detected during the course of a primary infection (Fig. 5, black histogram). Surviving mice were challenged with a second infectious dose 2 weeks after primary infection. IC-FACS analysis of CD4⁺ T cells isolated 48 h post-boost displayed an enhanced contribution to IFN-γ, TNF-α and IL-2 production, suggesting that CD4⁺ memory T cells have been probably generated during the primary infection (Fig. 5, dark grey histogram).

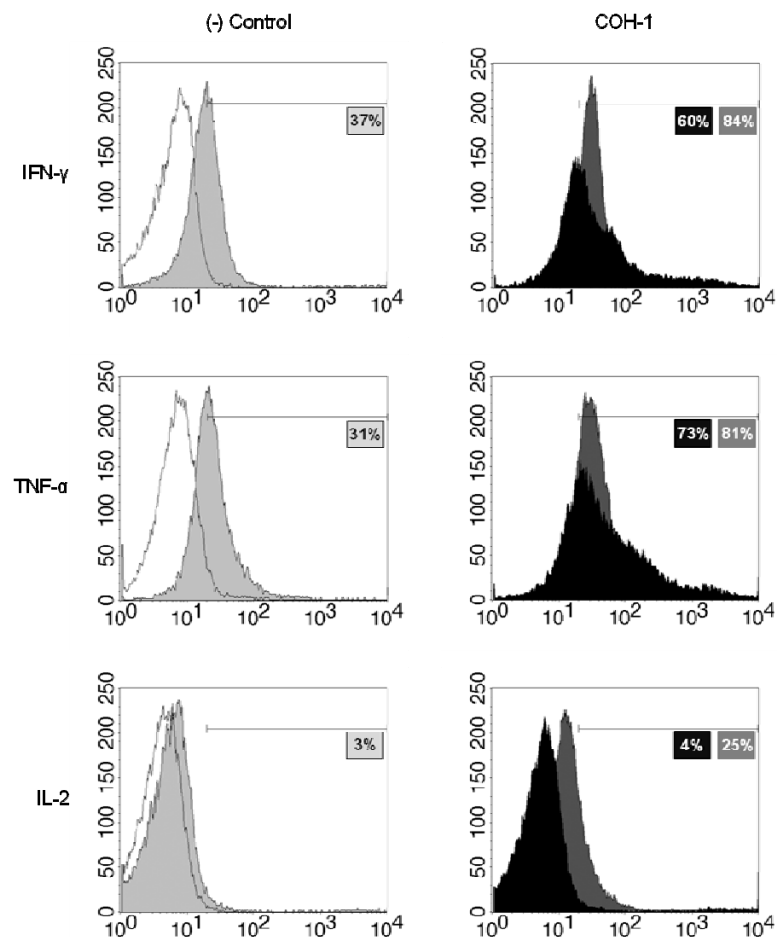
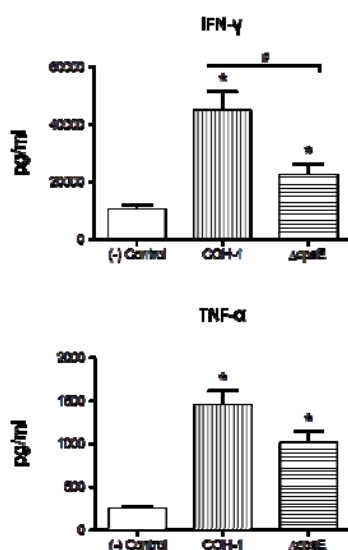


Fig. 5. *In vivo* CD4⁺ T cell contribution to cytokine production during primary and secondary GBS infections.

C57BL/6 mice were injected intra-peritoneally with a dose of 10^6 CFU of wild-type GBS serotype III strain COH-1. Surviving animals who had previously displayed clinical symptoms were boosted with a second dose of 1×10^6 CFU of GBS strain COH-1 two weeks after initial infection. Spleens of animals with clinical symptoms and positive bacteremia were harvested 96 h post-primary infection or 48 h post-boost infection ($n = 2$ per group \times 5 individual experimental infections). Five hours prior to spleen collection, mice were injected with Brefeldin A (200 μ g). Control (-) animals were similarly treated. Spleen CD4⁺ T cells were MACS-purified, stained intracellularly for different cytokines and analyzed by FACS. Representative data from 5 different experimental infections. Cytokine basal expression levels in (-) control animals were similar at 96 h post-primary mock-infection and 48 h post-secondary mock-infection. Representative histograms from the latter time point were selected for the figure.

The CPS of GBS modulates cytokine release by CD4⁺ T cells

As GBS COH-1 strain is a well encapsulated bacteria, we evaluated the impact of CPS on CD4⁺ T cell activation by using a non-encapsulated isogenic mutant, $\Delta cpsE$ strain. Non-encapsulated GBS mutants are non-virulent and rapidly cleared from circulation (20). Thus, to be able to directly compared WT GBS and the mutant strain, an *in vitro* DC-T cell co-culture system was established. Supernatants collected from co-cultures experiments were tested for the presence of CD4⁺ T cell-derived cytokines by ELISA. Results from WT GBS activated co-cultures revealed the presence of extremely high levels of IFN- γ (~ 45000



pg/ml), and significant levels of TNF- α (~ 1500 pg/ml). The loss of CPS was accompanied by a significant reduction in IFN- γ production (Fig. 6). DC-T cell co-cultures stimulated with the non-encapsulated mutant also showed reduced TNF- α production, however, this difference did not reach statistical significance ($P > 0.053$). Overall, these results suggest that DCs pulsed with non-encapsulated GBS induce a reduced cytokine response by CD4⁺ T cells compared to WT GBS-pulsed DCs.

Fig. 6. Role of bacterial capsular polysaccharide in the modulation of cytokine production by CD4⁺ T cells.

Dendritic cells (DCs) were infected with either wild-type GBS strain COH-1 or its non-encapsulated isogenic mutant $\Delta cpsE$ (MOI 1:1) for 1 h. Extracellular bacteria were killed by antibiotic treatment and cultures washed prior to addition of freshly isolated splenic CD4⁺ T cells from naïve mice (T cell: DC ratio of 5:1). Co-cultures were incubated for 48 h, resuspended in fresh medium containing 10 ng/ml of IL-2 for 72 h (resting period) and then transferred to anti-CD3 coated plates for 48 h. Supernatants were then collected and cytokines quantified by ELISA. Non-stimulated co-cultures served as negative (-) controls for basal expression. Data are expressed as means \pm SEM (in pg/ml) from 5 different experiments. * $P < 0.05$, indicates statistically significant differences compared to (-) control. # $P < 0.05$, indicates statistically significant differences between co-cultures infected with wild-type strain COH-1 and those infected with the non-encapsulated mutant $\Delta cpsE$.

The CPS of GBS affects surface expression of CD69 on activated CD4⁺ T cells

In addition to cytokine production, expression of surface molecules on CD4⁺ T cells is an essential event for proper T cell activation. We therefore also investigated how the CPS of GBS may affect expression of co-stimulatory molecules on activated CD4⁺ T cells. We selected CD69, as is recognized to be an important marker of T cell activation (26). In DC-T cell co-cultures, maximal CD69 expression was observed at 8 h of incubation, when an average 21.54% (\pm 1.36%) CD4⁺ T cells responding to WT GBS were stained positive for CD69 expression compared to 37.57% (\pm 2.77%) ($P < 0.01$) in co-cultures infected with the non-encapsulated mutant (Fig. 7). This difference in CD69 expression was gradually lost. At 24 h of co-culture incubation, an average of 15.89% (\pm 2.97%) CD4⁺ T cells responding to WT GBS stained positive for CD69 compared to 25.32% (\pm 5.28%) in co-cultures infected with the non-encapsulated strain ($P < 0.05$) (Fig. 7). At 48 h of co-culture incubation no significant differences in CD69 surface expression were observed between strains (data not shown).

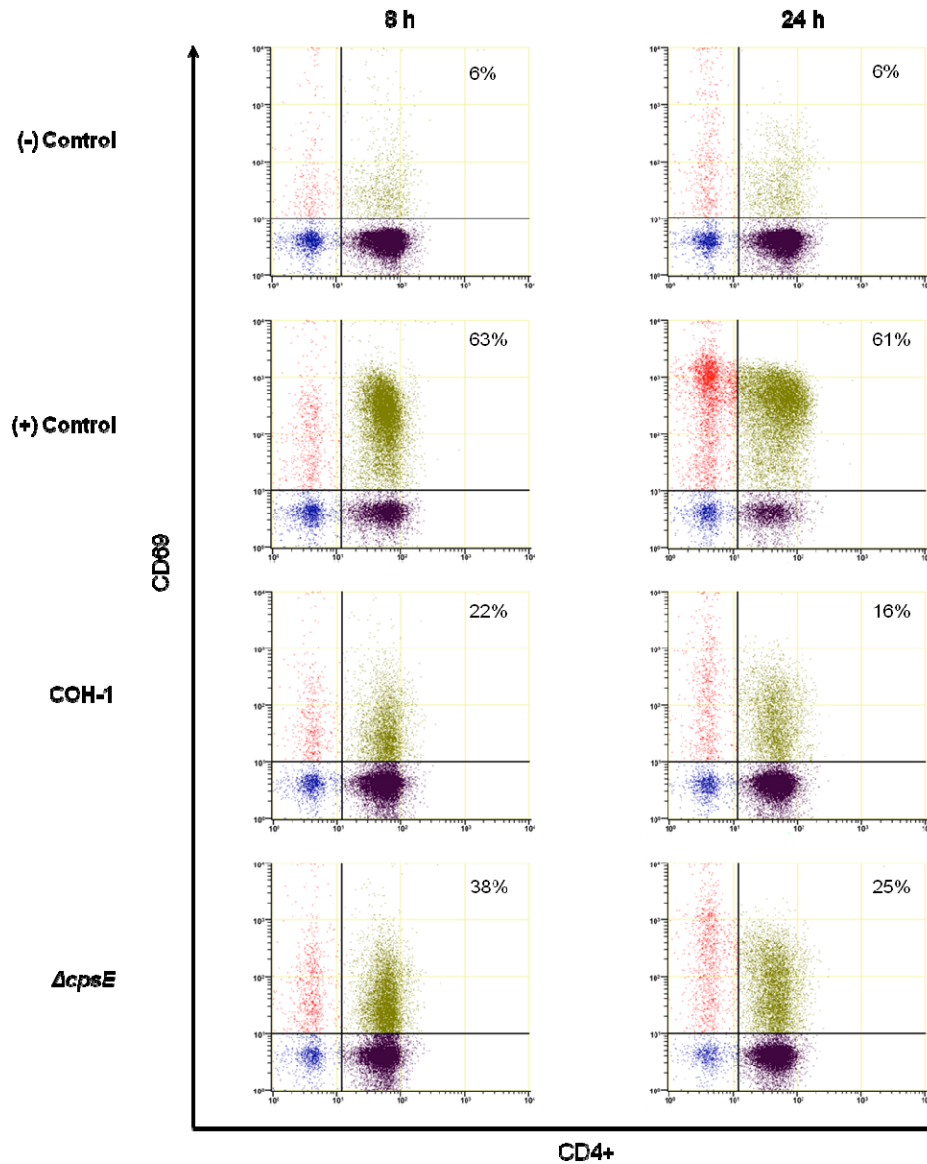


Fig. 7. Role of bacterial capsular polysaccharide in the modulation of CD4+ T cell surface expression of CD69.

Dendritic cells (DCs) were infected with either wild-type GBS strain COH-1 or its non-encapsulated isogenic mutant $\Delta cpsE$ (MOI 1:1) for 1 h. Extracellular bacteria were killed by antibiotic treatment and cultures washed prior to addition of freshly isolated splenic CD4+ T cells from naïve mice (T cell: DC ratio of 5:1). Co-cultures were incubated for 8 h and 24 h, cells harvested and CD69 expression analyzed by FACS. Co-cultures incubated with medium alone or Concanavalin (0.1 $\mu\text{g/ml}$) served as negative (-) and positive controls (+), respectively. Representative data from 3 different experiments. Numbers in the upper quadrants indicate the % of CD4+CD69+ cells.

Discussion

Although information is becoming increasingly available on the interactions between GBS and cells of innate immunity, such as DCs, macrophages and neutrophils, no work to date has focused on activation profiles of cells of adaptive immunity during GBS infection. This study addresses for the first time how CD4⁺ T cells contribute to the development of immune functions during GBS type III infection using *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro* analysis.

In the case of GBS, cytokines are not only important for the appropriate development of host defences but are also involved in induction of severe pathologies, such as sepsis and meningitis. Initial *ex vivo* analysis of cytokine production by total splenocytes derived from encapsulated GBS infected mice revealed the presence of IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-10. Production of IFN- γ , TNF- α and IL-6 is suggestive of a type 1 pro-inflammatory response being developed shortly after infection, while IL-10 production can be related to immune-regulation. It is interesting to note that TNF- α and IL-6 have routinely been reported as important mediators of GBS sepsis (6, 7). This observation might also highlight the particular importance of IL-10 in maintaining homeostasis. Indeed, a role of this cytokine in protecting neonatal mice from developing GBS sepsis by reducing TNF- α production has been reported (6).

Several cell types have been reported to secrete TNF- α , IL-6 and/or IL-10, including DCs, monocytes and macrophages when responding to GBS (15, 16, 27-29). On the other hand, sources of IFN- γ remain poorly identified. Indeed, early works reporting IFN- γ production were mostly focused on GBS-infected total splenocyte cultures or mixed mononuclear cells, without identifying the cellular source of this cytokine (7, 10, 16). In the present study we defined the potential role of T cells in IFN- γ production. *Ex vivo* and *in vivo* analysis showed that CD4⁺ T cells are important producers of IFN- γ and TNF- α during GBS infection. Activated T cells also produce low, but still significant levels of IL-2, overall suggesting the development of a Th1 response. Results from surviving animals that were challenged with a booster infectious dose two weeks later showed that CD4⁺ T cells respond to infection by producing the same pattern of cytokines. This response was more efficient and faster, suggesting generation of memory cells (30). A important contribution of NK to the IFN- γ response was also evidenced *in vivo*, as previously suggested by *in vitro* studies using cultured splenocytes from severe combined immunodeficiency mice (13).

Purified GBS glycolipids have been shown to activate NKT cells (14). However, the contribution of these cells to IFN- γ production in the course of GBS infection was very limited, even at earlier time points (unpublished observations).

Early chemokine release by cells of the innate immunity plays an important role in attracting various accessory immune cells to the site of infection, such as T cells. *Ex vivo* analysis of chemokine production by total splenocyte suggested that T cells are actively recruited via the expression of three important chemokines: CCL3, CXCL9 and CXCL10. It is interesting to note that CXCL9 and CXCL10 are two chemokines that bind to CXCR3 receptor, and more importantly, are induced by IFN- γ . CXCR3 is rapidly induced on naive T cells following activation and preferentially remains highly expressed on Th1-type CD4⁺ T cells (25). In the context of a systemic infection with GBS, several cells types in the spleen are potential sources of these three chemokines. GBS-stimulated spleen DCs were reported to produce CXCL9 and CXCL10 (15). Although up-regulation of *Cxcl10* gene expression was observed by DNA microarray analyses of mouse peritoneal macrophages (29), GBS was reported to be unable to induce neither CXCL10 nor CXCL9 secretion by these cells (31). On the other hand, both macrophages and DCs seem to contribute to CCL3 production (29, 31)(unpublished observations).

As GBS possesses a thick CPS, known to be the most important virulence factor, we were interested in evaluating whether the presence of CPS has the potential to modulate CD4⁺ T cell activation. To this aim, type III encapsulated GBS strain and its non-encapsulated isogenic mutant were used for *in vitro* infections. Similarly to *ex vivo* and *in vivo* results, DCs pulsed with WT GBS induced the release of high levels of IFN- γ and TNF- α by CD4⁺ T cells. The production of IFN- γ was significantly decreased when using DCs pulsed with non-encapsulated GBS. Production of TNF- α was also slightly reduced. It is surprising that the loss of capsule is not associated with an exaggerated immune response or increased IFN- γ production by T cells, as reported for other encapsulated pathogens (32-34). However, studies on DC activation by GBS have shown similar trends. Indeed, it has been reported that WT GBS induces similar or even stronger cytokine production by infected DCs than non-encapsulated mutant-infected counterparts (15). The only exception was IL-10, which production was significantly higher in DCs infected with the non-encapsulated mutant than those infected with the WT strain (15). In this study two interrelated hypothesis were suggested by the authors to explain these observations, a) increased IL-10 production

by DCs in the absence of CPS reduce the production of other cytokines; or b) higher and faster levels of non-encapsulated bacterial killing reduce or impair cytokine production by DCs (15, 21). In addition, it was reported that the presence of CPS modulates the endocytic pathways engaged by DCs for GBS up-take (21). It was demonstrated with murine macrophages that the route of entry engaged by a particular pathogen influences the repertoires of epitopes presented to CD4⁺ T cells and thus, by extension, may affect the ensuing immune response (35). Thus, in our DC-T cell co-culture system, the consequence of DC modulation by the non-encapsulated strain may be translated into lower levels of IFN- γ production by CD4⁺ T cells. In contrast to cytokine production, the surface expression of the T cell activation marker CD69 was higher (early time points) or similar (late time points) in CD4⁺ T cells co-cultured with non-encapsulated mutant-pulsed DCs compared to WT GBS-infected co-cultures. The observed differences could just be related to a delayed kinetics of CD69 expression in mutant-infected co-cultures. In fact, attempting to explain modulation of CD69 expression on CD4⁺ T cells is quite difficult, due to the lack of information available on this particular surface marker. Although it is well known that CD69 is one of the earliest markers induced upon activation of T and acts as a signal-transmitting receptor for immune-regulatory events, its cognate ligand is still unknown (26). Of the few studies available on CD69 expression by T cells upon streptococcal infection, Harimaya *et al.* demonstrated a dose-dependent up-regulation of CD69 on CD3⁺ T cells from peripheral blood lymphocytes infected with *Streptococcus pneumoniae*. Yet, authors failed to correlate CD69 surface expression and IFN- γ production by these target cells (36). In a more recent study using a *S. pneumoniae* mouse model of infection, CD4⁺ T cells exhibited significant up-regulation of CD69 in the spleen at 48 h post-infection. As this response was MHC-II unrestricted, authors suggested that this increased CD69 expression on T cells is not a consequence of their direct interaction with pneumococci or presented antigen but is due to secondary factors, e.g., cytokines released by other host cells (37). Likely, a possible polyclonal (indirect) activation of T cells in our system cannot be ruled out. Nevertheless, it should be highlighted that in our co-culture system, GBS failed to directly activate T cells in the absence of accessory cells (data not shown), similarly to that reported for *S. pneumoniae* (34, 37). Finally, it has been recently suggested that CD69 controls the cross-talk between innate components and lymphocytes and plays an immuno-regulatory role by preventing infection-induced immunopathology (38). Enhanced expression by CD69 may result in reduced IFN- γ production by CD4⁺ T cells (39).

Undoubtedly, IFN- γ production by CD4⁺ T cells during GBS infection is crucial for host defence (8), but might also result in disease pathology, as suggested in the mouse model of pneumococcal sepsis (37). Although this study characterized for the first time IFN- γ production by CD4⁺ T cells, a definitive understanding of all mechanisms regulating IFN- γ production during GBS infection requires further research. For instance, as the CPS confers a survival advantage to GBS (15, 21), persistence of GBS within antigen-presenting cells may affect their activation and thus the ensuing T cell immune response, including altered IFN- γ and CD69 expression balance early during infection.

Acknowledgements

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through grant to MS (#342150-2013) and by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Canada Foundation for Innovation (CFI) through grants to JT (CIHR #93592). PL is the recipient of a PhD Award granted by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies.

References

1. **Melin P.** 2011. Neonatal Group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. *Clin Microbiol Infect* **17**:1294-1303.
2. **Verani JR, Schrag SJ.** 2010. Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges. *Clin Perinatol* **37**:375-392.
3. **Edwards MS, Baker CJ.** 2005. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* **41**:839-847.
4. **Maisey HC, Doran KS, Nizet V.** 2008. Recent advances in understanding the molecular basis of Group B *Streptococcus* virulence. *Expert Rev Mol Med* **10**:e27.
5. **Wennekamp J, Henneke P.** 2008. Induction and termination of inflammatory signaling in Group B streptococcal sepsis. *Immunol Rev* **225**:114-127.
6. **Cusumano V, Genovese F, Mancuso G, Carbone M, Fera MT, et al.** 1996. Interleukin-10 protects neonatal mice from lethal Group B streptococcal infection. *Infect Immun* **64**:2850-2852.
7. **Teti G, Mancuso G, Tomasello F.** 1993. Cytokine appearance and effects of anti-tumor necrosis factor alpha antibodies in a neonatal rat model of Group B streptococcal infection. *Infect Immun* **61**:227-235.
8. **Cusumano V, Mancuso G, Genovese F, Delfino D, Beninati C, et al.** 1996. Role of gamma interferon in a neonatal mouse model of Group B streptococcal disease. *Infect Immun* **64**:2941-2944.

9. **Cusumano V, Midiri A, Cusumano VV, Bellantoni A, De Sossi G, et al.** 2004. Interleukin-18 is an essential element in host resistance to experimental Group B streptococcal disease in neonates. *Infect Immun* **72**:295-300.
10. **Mancuso G, Cusumano V, Genovese F, Gambuzza M, Beninati C, et al.** 1997. Role of interleukin 12 in experimental neonatal sepsis caused by Group B streptococci. *Infect Immun* **65**:3731-3735.
11. **Lewis DB, Larsen A, Wilson CB.** 1986. Reduced interferon-gamma mRNA levels in human neonates. Evidence for an intrinsic T cell deficiency independent of other genes involved in T cell activation. *J Exp Med* **163**:1018-1023.
12. **Wilson CB.** 1986. Immunologic basis for increased susceptibility of the neonate to infection. *J Pediatr* **108**:1-12.
13. **Derrico CA, Goodrum KJ.** 1996. Interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha mediate innate production of gamma interferon by Group B *Streptococcus*-treated splenocytes of severe combined immunodeficiency mice. *Infect Immun* **64**:1314-1320.
14. **Kinjo Y, Illarionov P, Vela JL, Pei B, Girardi E, et al.** 2011. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat Immunol* **12**:966-974.
15. **Lemire P, Houde M, Lecours MP, Fittipaldi N, Segura M.** 2012. Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic cells. *Microbes Infect* **14**:1064-1076.
16. **Kwak DJ, Augustine NH, Borges WG, Joyner JL, Green WF, et al.** 2000. Intracellular and extracellular cytokine production by human mixed mononuclear cells in response to Group B streptococci. *Infect Immun* **68**:320-327.
17. **La Pine TR, Joyner JL, Augustine NH, Kwak SD, Hill HR.** 2003. Defective production of IL-18 and IL-12 by cord blood mononuclear cells influences the T helper-1 interferon gamma response to Group B streptococci. *Pediatr Res* **54**:276-281.
18. **Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, et al.** 2005. Structural and genetic diversity of Group B *Streptococcus* capsular polysaccharides. *Infect Immun* **73**:3096-3103.
19. **Carlin AF, Uchiyama S, Chang YC, Lewis AL, Nizet V, et al.** 2009. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood* **113**:3333-3336.
20. **Doran KS, Nizet V.** 2004. Molecular pathogenesis of neonatal Group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Mol Microbiol* **54**:23-31.
21. **Lemire P, Houde M, Segura M.** 2012. Encapsulated Group B *Streptococcus* modulates dendritic cell functions via lipid rafts and clathrin-mediated endocytosis. *Cell Microbiol* **14**:1707-1719.
22. **Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, et al.** 2009. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* **10**:587-594.
23. **Costa A, Gupta R, Signorino G, Malara A, Cardile F, et al.** 2012. Activation of the NLRP3 inflammasome by Group B streptococci. *J Immunol* **188**:1953-1960.
24. **Dominguez-Punaro Mde L, Segura M, Radzioch D, Rivest S, Gottschalk M.** 2008. Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. *Infect Immun* **76**:3901-3910.
25. **Groom JR, Luster AD.** 2011. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res* **317**:620-631.
26. **Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR.** 1994. The activation antigen CD69. *Stem Cells* **12**:456-465.

27. **Bebien M, Hensler ME, Davanture S, Hsu LC, Karin M, et al.** 2012. The pore-forming toxin beta hemolysin/cytolysin triggers p38 MAPK-dependent IL-10 production in macrophages and inhibits innate immunity. *PLoS Pathog* **8**:e1002812.
28. **De Francesco MA, Gargiulo F, Negrini R, Gelmi M, Manca N.** 2008. Different sequence strains of *Streptococcus agalactiae* elicit various levels of cytokine production. *Immunol Invest* **37**:741-751.
29. **Draper DW, Bethea HN, He YW.** 2006. Toll-like receptor 2-dependent and -independent activation of macrophages by Group B streptococci. *Immunol Lett* **102**:202-214.
30. **Zhang Q, Bagrade L, Clarke E, Paton JC, Nunez DA, et al.** 2010. Bacterial lipoproteins differentially regulate human primary and memory CD4+ T and B cell responses to pneumococcal protein antigens through Toll-like receptor 2. *J Infect Dis* **201**:1753-1763.
31. **Fan H, Williams DL, Zingarelli B, Breuel KF, Teti G, et al.** 2007. Differential regulation of lipopolysaccharide and Gram-positive bacteria induced cytokine and chemokine production in macrophages by Galpha(i) proteins. *Immunology* **122**:116-123.
32. **Kolb-Maurer A, Unkmeir A, Kammerer U, Hubner C, Leimbach T, et al.** 2001. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Infect Immun* **69**:6912-6922.
33. **Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, et al.** 2011. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis* **204**:919-929.
34. **Olliver M, Hiew J, Mellroth P, Henriques-Normark B, Bergman P.** 2011. Human monocytes promote Th1 and Th17 responses to *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **79**:4210-4217.
35. **von Delwig A, Bailey E, Gibbs DM, Robinson JH.** 2002. The route of bacterial uptake by macrophages influences the repertoire of epitopes presented to CD4 T cells. *Eur J Immunol* **32**:3714-3719.
36. **Harimaya A, Himi T, Fujii N, Tarkkanen J, Carlson P, et al.** 2005. Induction of CD69 expression and Th1 cytokines release from human peripheral blood lymphocytes after in vitro stimulation with *Alloiococcus otitidis* and three middle ear pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* **43**:385-392.
37. **LeMessurier K, Hacker H, Tuomanen E, Redecke V.** 2010. Inhibition of T cells provides protection against early invasive pneumococcal disease. *Infect Immun* **78**:5287-5294.
38. **Vega-Ramos J, Alari-Pahissa E, Valle JD, Carrasco-Marin E, Esplugues E, et al.** 2010. CD69 limits early inflammatory diseases associated with immune response to *Listeria monocytogenes* infection. *Immunol Cell Biol* **88**:707-715.
39. **Radulovic K, Manta C, Rossini V, Holzmann K, Kestler HA, et al.** 2012. CD69 regulates type I IFN-induced tolerogenic signals to mucosal CD4 T cells that attenuate their colitogenic potential. *J Immunol* **188**:2001-2013.

ANNEXE V, ARTICLE XI**“Immune-responsiveness of CD4⁺ T cells during *Streptococcus suis* serotype 2 infection”**

Marie-Pier Lecours, Damian Clarke, Paul Lemire, Corinne Letendre, Tristan Galbas, Jacques Thibodeau, Marcelo Gottschalk and Mariela Segura.

Manuscrit en préparation pour soumission dans *Journal of Immunology*

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article :

J'ai participé aux expériences *in vivo* de l'article, plus spécifiquement aux expériences reliées au FACS.

Immune-responsiveness of CD4⁺ T cells during *Streptococcus suis* serotype 2 infection

Marie-Pier Lecours¹, Damian Clarke¹, Paul Lemire¹, Corinne Letendre¹, Tristan Galbas², Jacques Thibodeau², Marcelo Gottschalk¹ and Mariela Segura^{1*}.

¹Laboratory of Immunology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada; ²Laboratory of Molecular Immunology, Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title: CD4⁺ T cell-responses during *S. suis* infection

Keywords: *Streptococcus suis*; immune response; T cells; dendritic cells, capsular polysaccharide

* Corresponding author. Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada. Tel.: +1 450 773 8521, ext. 0080; fax: +1 450 778 8108.

Abstract

Streptococcus suis is an important swine pathogen and an emerging zoonotic agent of septicemia and meningitis. Knowledge of host immune responses to *S. suis*, and strategies used by this pathogen for subversion of these responses is scarce. Previous results demonstrated that dendritic cells (DCs) are activated after *S. suis* infection, undergoing a maturation process characterized by the up-regulation of co-stimulatory molecules and cytokine production. However, *S. suis* possesses virulence factors, such as the capsular polysaccharide, able to modulate DC functions, and potentially leading to a diminished immune response. The objective of the present study was to evaluate the consequences of the modulation of DC functions on T cell activation. In response to *S. suis* infection, total splenocytes readily produced TNF- α , IL-6, IFN- γ , CCL3, CXCL9 as well as IL-10. *Ex vivo* and *in vivo* analysis revealed the involvement of CD4⁺ T cells and development of a Th1 response. Nevertheless, levels of Th1-derived cytokines TNF- α and IFN- γ during live *S. suis* infection were very low. In addition, CD4⁺ T cells were shown to also secrete IL-10 and failed to up-regulate optimal levels of CD40L and CD69. The bacterial capsular polysaccharide was shown to interfere with the release of several T cell-derived cytokines *in vitro*. As a consequence, a clinical infection resulted in low levels of not only anti-*S. suis* antibodies but also of those directed against ovalbumin, used as reported antigen. This interference was correlated with the presence of severe clinical signs of *S. suis* disease. A transient depletion of CD4⁺ T cells in the spleen and poor generation of a memory response were also observed. Overall, these data suggest that *S. suis* impairs the development of an efficient adaptive immune response, which is required to control the infection progress.

Abbreviations

APC	allophycocyanin	IL	interleukin
CCL	chemokine ligand	I.P.	intraperitoneal
CFU	Colony-forming unit	MACS	magnetic-activated cell sorting
ConA	concanavalin A	MOI	multiplicity of infection
CPS	capsular polysaccharide	Ova	ovalbumine
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand	PE	phycoerythrin
DC	dendritic cell	PE-Cy7	phycoerythrin-cyanine 7
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	NK	natural killer
FACS	fluorescence-activated cell sorting	NKT	natural killer t
FITC	fluorescein isothiocyanate	STSLs	streptococcal toxic shock-like syndrome
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor	Th	T helper
IC	intracellular	TNF	tumor necrosis factor
IFN	interferon	Treg	regulatory T cell
		WT	wild-type

Introduction

Streptococcus suis is a major swine pathogen mainly associated with meningitis, although other systemic infections have been described (1, 2). *S. suis* is now emerging as a threat to human health, especially in Asian countries where it has recently been identified as the leading cause of adult meningitis in Vietnam, the second in Thailand, and the third in Hong Kong (2). Moreover, two important human outbreaks of streptococcal toxic shock-like syndrome (STSLS) due to *S. suis* occurred in China during the last years with a fatality rate near 20% (2). Among 35 serotypes that have been described, serotype 2 is the most virulent for both pigs and humans, and most of the studies have been performed with this serotype. The capsular polysaccharide (CPS), which defines the serotype, is considered a major virulence factor of *S. suis* serotype 2 (3).

Dendritic cells (DCs) are powerful antigen-presenting cells and are critical for bridging innate and adaptive immune responses (4). DCs capture and process invading pathogens to present their antigens to corresponding lymphocytes. Following antigen uptake, DCs undergo a maturation process characterized by the expression of different cell surface molecules and the release of cytokines. After DC migration to draining lymph nodes, co-stimulatory molecules bind to naïve T cells, leading to T cell activation (4). The production of cytokines, such as interleukin (IL)-12, by mature DCs provides additional signals for the acquisition of T cell effector functions.

CD4⁺ T cells are important for the development of immunity to bacterial infections. After interaction with their cognate antigen presented by activated DCs, naïve CD4⁺ T cells proliferate and polarize towards different CD4⁺ lineages, which then shape the immune response. The best characterized CD4⁺ lineages are T helper type 1 (Th1), which drives the immune response mainly against intracellular pathogens; Th2, which promotes humoral responses; Th17, which contributes to the elimination of extracellular pathogens; and various regulatory T cell (Treg) populations, which prevent the development of autoimmunity (5). However, there is accumulating evidence that the CD4⁺ T cell lineages are not as stable as initially thought. Substantial heterogeneity and plasticity, as assessed by cytokine production patterns, has been observed within these subsets, particularly when generated *in vivo* and during an infection (5). Hence, it seems more likely that multiple polarized CD4⁺ T cell subsets are generated. These effector cells secrete large quantities of cytokines and

chemokines (6). For exempla, the Th1 cells secrete great amounts of IFN- γ , TNF- α , and IL-2 whereas the Th2 cells secrete high levels of IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13 (6).

Despite the increasing number of studies, the pathogenesis of the *S. suis* infection is still not completely understood and, to date, attempts to control the infection are hampered by the lack of an effective vaccine. Mouse bone marrow-derived DCs have been shown to be a valid and interesting model to study the host immune response during *S. suis* infection (7, 8). There is evidence that mouse DCs are activated after *S. suis* infection, undergoing a maturation process characterized by the up-regulation of the co-stimulatory molecules CD40 and CD86 as well as cytokine and chemokine production, including TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p70, and IL-23 (7, 8). However, *S. suis* possesses virulence factors able to modulate DC functions, particularly cytokine release and opsono-phagocytosis, potentially leading to a diminished immune response (7, 8). In fact, the CPS was shown to strongly reduce DC activation/maturation and *S. suis* internalization and/or to modulate the IL-10/IL-12 and IL-10/TNF- α cytokine production in favor of a more anti-inflammatory profile by either human-, mouse- or swine-derived DCs (7, 9, 10). In this study, we hypothesized that encapsulated *S. suis* modulation of DC functions affects the development of T cell-dependent immune responses. Indeed, this study addresses for the first time the role of CD4⁺ T cells in the host adaptive immune response against *S. suis* and the potential contribution of the bacterial CPS to the modulation of this response.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

The *S. suis* serotype 2 virulent strain P1/7, originally isolated from a case of porcine meningitis, and its isogenic non-encapsulated mutant strain $\Delta cpsF$ were used. These strains were already used in previous studies (9, 11). *S. suis* strains were grown on sheep blood agar plates at 37°C for 18 h and isolated colonies were used as inocula for Todd–Hewitt Broth (THB; Becton Dickinson), which was incubated 8 h at 37 °C with agitation. Working cultures were obtained by inoculating 10 μ l of a 10⁻³ dilution of these cultures in 30 ml of THB and incubating for 16 h at 37 °C with agitation. Bacteria were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, and appropriately diluted in fresh medium to

desired inoculum concentrations. The number of CFU/ml in the final suspension was determined by plating samples onto THB agar using an Autoplate 4000 Automated Spiral Plater (Spiral Biotech).

Mice and experimental infections

All experiments were performed with 5 week-old female, C57BL/6 mice (Charles River Laboratories) and were conducted in accordance with the guidelines and policies of the Canadian Council on Animal Care and the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the Animal Welfare Committee of Université de Montréal. Mice were acclimatized to standard laboratory conditions of 12-h light/12-h dark cycle with free access to rodent chow and water. On the day of the experiment, a 1 ml volume of either the bacterial suspension or the vehicle solution (sterile THB) was administered by intraperitoneal injection (i.p.). Mice were closely monitored daily to record mortality and clinical signs of disease, such as depression, rough appearance of hair coat and swollen eyes (12, 13). Mice exhibiting extreme lethargy were considered moribund and were humanely euthanized. To determine the level of infection, numbers of viable bacteria in blood were quantified at different times post-infection. Blood (5 μ l) was collected from the tail vein, serially diluted in PBS and plated using an Automated Spiral Plater. Blood agar plates were incubated overnight at 37°C. Colonies were counted and expressed as CFU/ml.

Generation of mouse bone marrow-derived dendritic cells

DCs were generated from naïve C57BL/6 mice as previously described (7). Briefly, bone marrow was removed from femurs and tibiae. After red blood cell lysis, total bone marrow cells (2.5×10^5 cells/ml) were cultured in complete medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 20 μ g/ml gentamycin, 100 U/ml penicillin-streptomycin, 2 mM L-glutamine and 50 μ M 2-mercaptoethanol (Gibco, Invitrogen). Complete medium was complemented with 20% GM-CSF from a mouse GM-CSF-transfected cell line (Ag8653) as a source of GM-CSF (14). Cells were cultured for 7 days at 37 °C in a 5% CO₂ incubator and were fed on days 3 and 5. On day 7, clusters were harvested and subcultured overnight to remove adherent cells. Non-adherent cells were collected on day 8, washed, and used as immature DCs for

the studies. Cell purity was routinely 86-90% CD11c^{high} and F4/80^{-dim} cells as determined by FACS analysis and as previously reported (7).

Isolation of splenic CD4+ T cells

Untouched CD4+ T cells were purified from the spleen of either naïve or infected C57BL/6 mice by negative selection using CD4+ T cell isolation kit II according to the manufacturer's instructions (MACS, Miltenyi Biotec). Briefly, spleens were harvested from naïve or infected mice at the indicated times (see below) and perfused with RPMI complete medium (without antibiotics), teased apart, and pressed gently through a sterile fine wire mesh. The red blood cells were removed by incubation with NH₄Cl lysing buffer (eBioscience). To obtain CD4+ T cells, splenocytes were suspended in sterile PBS containing 2 mM EDTA and separated using Lympholyte-M density gradient (Cedarlane Lab.). Low-density cells at the interphase were collected and further purified by magnetic-activated cell sorting (MACS) negative selection as mentioned above. The enriched CD4+ T cells had > 95% purity as determined by FACS using anti-CD3 and anti-CD4 staining (data not shown).

In vivo infection model

For *in vivo* CD4+ T cell analysis, mice were injected i.p. with 1×10^7 CFU of *S. suis* strain P1/7, based on previous work (15). Surviving animals that had previously displayed clinical symptoms were boosted with a second dose of 1×10^7 CFU of *S. suis* strain P1/7 two weeks after initial infection. Bacteremia was monitored during the first 72 h post-primary infection or the first 24 h post-boost infection. Spleens of animals with clinical symptoms and positive bacteremia were harvested 96 h post-primary infection or 48 h post-boost infection ($n = 2$ per group \times 5 individual experimental infections). Before harvesting, mice were injected i.p. with 500 μ l of 200 μ g of Brefeldin A solution in PBS (eBioscience) 5 h prior to spleen collection. Control (placebo) animals were similarly treated. Spleen CD4+ T cells were purified as described above, in the presence of Brefeldin A solution during all the purification steps. The selected time-points are based in pre-trial analysis using different post-infection times (data not shown). Purified CD4+ T cells were analyzed for cytokine production by intracellular staining followed by flow cytometry analysis (IC-FACS, see below).

For quantification of total number of splenic CD3+CD4+ T cells or CD3+CD8+ T cells during the infection, spleens (n = 4 per group x 2 individual experimental infections) were collected at different times post-primary infection (2, 4, 6 and 8 d) and post-boost infection (2, 4, 6 and 8 d) and cells quantified by FACS (see below). To measure the *S. suis* specific primary antibody response, sera from infected mice were collected 14 days after primary infection (n = 10).

Ex vivo analysis of total splenocytes

C57BL/6 mice were injected i.p with a dose of 5×10^7 CFU of *S. suis* strain P1/7. Control mice were injected with the vehicle solution (sterile THB) (n = 3 per group x 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h post-infection, perfused with RPMI complete medium (without antibiotics), teased apart, and pressed gently through a sterile fine wire mesh. After red blood cells lysis and washing, total splenocytes were plated at a concentration of 5×10^6 cells/ml in RPMI complete medium (without antibiotics) in 24-well flat bottom plates, and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 48 h. However, after the initial 6 h of *ex vivo* incubation, gentamycin (Gibco) was added to the culture to prevent cell toxicity. Total splenocytes from control (placebo) animals were similarly treated. Concanavalin A (ConA, 0.1 µg/ml, Sigma-Aldrich) was used as positive control. Supernatants were harvested at the indicated time point for cytokine analysis by ELISA. In selected experiments, total splenocytes were incubated *ex-vivo* for 14 h or 48 h as described above. However, brefeldin A (3 µg/ml) was added during the last 5 h, and either total splenocytes or CD4+ T cells (MACS-isolated from the culture wells) were analyzed by IC-FACS (see below). The above described final culture conditions for *ex vivo* analysis were selected based on multiple pre-trials using different post-infection times (6 h and 12 h) combined with 14, 24, 48 and 72 h *ex-vivo* incubation times (data not shown).

In vitro DC-T cell co-culture model

For the co-culture model, 1×10^5 DCs were plated in 48-well flat bottom plates for 1 h at 37°C with 5% CO₂. Afterwards, 1×10^5 CFU of either wild-type (WT) *S. suis* strain P1/7 or $\Delta cpsF$ mutant strain (MOI: 1) were added to wells for 1 h. Extracellular bacteria were killed using 100 µg/ml of gentamycin and 5 µg/ml of penicillin G (Sigma-Aldrich) as previously described (9). After 1 h of antibiotic treatment and 3 washing steps, 5×10^5

freshly isolated CD4⁺ T cells from naïve mice (T cell: DC ratio of 5:1) were added to the wells. Co-cultures incubated with medium alone served as negative. Co-cultures treated with either ConA (0.1 µg/ml) or phorbol myristate acetate (PMA, 15 ng/ml) + ionomycin (150 ng/ml) served as positive controls. For FACS analysis of surface marker expression, co-culture plates were incubated for 3, 8, 24 and 48 h at 37 °C, 5% CO₂, prior to cell harvesting and FACS analysis. For T cell cytokine expression, co-culture plates were incubated for 48 h, then centrifuged and replenished with fresh medium containing 10 ng/ml of mouse rIL-2 (Miltenyi Biotec). Plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 3 days allowing a resting period for activated T cells. After 3 days, T cells were harvested, washed, and seeded into 96 well flat-bottom culture plates coated with 5 µg/ml of anti-mouse-CD3 mAb (BD Pharmingen) at a final concentration of 1 x 10⁵ cells/well. These plates were incubated for 48 h at 37°C, 5% CO₂ prior to supernatant harvesting for ELISA testing. Single cell cultures (either DC alone or T cell alone) were also included as controls. No significant cytokine production was observed in single cell cultures under this protocol conditions (data not shown).

Cytokine quantification by ELISA

Levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ, CCL3 (MIP-1α) and CXCL9 (MIG) in cell culture supernatants were measured by sandwich ELISA using pair-matched antibodies from R&D Systems, according to the manufacturer's recommendations. Twofold dilutions of recombinant murine cytokines were used to generate the standard curves. Sample dilutions giving optical density readings in the linear portion of the appropriate standard curve were used to quantify the levels of each cytokine. Absorbance was measured at 450 nm. The results are from at least three independent ELISA measurements.

FACS analysis

For cell surface staining of *in vitro* co-cultures, 10⁶ cells were washed and treated for 15 min on ice with FcR-blocking reagent (FcγIII/II R_c Ab) in sorting buffer (PBS-1% fetal bovine serum). Blocked cells were then incubated with FITC-conjugated anti-mouse CD4 mAb (clone GK1.5) for 30 min on ice followed by washing and staining for 30 min with PE-conjugated anti-mouse CD69 mAb (clone H1.2F3) or CD40L mAb (clone MR1). All reagents were from BD PharMingen. FACS was performed using a Cell Lab QuantaTM SC MPL

MultiPlate Loader instrument (Beckman Coulter). Twenty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using Cell Lab Quanta Collection/Analysis software. Quadrants were drawn based on FITC- and PE-control stains and were plotted on logarithmic scales.

For IC-FACS of MACS-purified CD4⁺ T cells from *in vivo* or *ex vivo* experiments, cells were blocked as described above followed by fixation and permeabilization using IC Fixation/Permeabilization eBioscience kit as per the manufacture's recommendation. Permeabilized cells were then stained for 20 min at room temperature with PE-conjugated mAbs (eBioscience) directed against the following intracellular molecules: IFN- γ (clone XMG1.2), TNF- α (clone MP6-XT22), IL-2 (clone JES6-5H4), or IL-10 (clone JES5-16E3). FACS was performed using a FACSCalibur instrument (BD Biosciences). Twenty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using CellQuest software. Histograms were drawn based on PE-control stain and were plotted on logarithmic scales.

For multi-parametric IC-FACS of *ex vivo* cultures of total splenocytes, cells were washed and blocked as described above followed by surface staining with PE-conjugated anti-CD19 (clone 6D5), PE-Cy7-conjugated anti-NK-1.1 (clone PK136), FITC-conjugated anti-CD3 (clone 17A2) and/or PE-conjugated CD69 (clone H1.2F3, BD Pharmingen) for 30 min on ice. Following fixation and permeabilization, intracellular staining was performed with APC-conjugated anti-IFN- γ (clone XMG1.2) or APC-conjugated anti-TNF- α (clone MP6-XT22) for 45 min at room temperature. Unless otherwise specified, all mAbs were from Biolegend. FACS was performed using a FACSCanto II instrument (BD Biosciences). Fifty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using FACSDiva™ software. Fluorescence Minus One (FMO) control staining was performed for proper analysis and gating of target cells.

For quantification of splenic CD4⁺ T cells during the infection, spleens collected at different times post-primary infection and post-boost infection were processed as described above and 10⁶ cells were washed and treated for 15 min on ice with FcR-blocking reagent in sorting buffer. Blocked cells were then incubated with PE-Cy5-labeled anti-mouse CD3 mAb (clone 145-2C11, BD Pharmingen) for 30 min on ice followed by washing and staining for 30 min with FITC-labeled anti-mouse CD4 mAb (clone GK1.5, BD Pharmingen) and PE-

labeled anti-mouse CD8 mAb (clone 53-6.7, BD Pharmingen). FACS was performed using a Cell Lab QuantaTM SC MPL MultiPlate Loader instrument. Twenty thousand gated events were acquired per sample and data analysis was performed using Cell Lab Quanta Collection/Analysis software. Quadrants were drawn based on FITC- and PE-Cy5-control stains and were plotted on logarithmic scales.

ELISA for S. suis-specific antibodies

Titers of *S. suis*-specific total Ig and IgG subclasses in mouse sera were determined by ELISA. Polysorp immunoplates (Nunc) were coated with *S. suis* strain P1/7. Briefly, after bacterial growth and washing steps, bacteria were resuspended in sterile water at a concentration of 1×10^7 CFU/ml and 100 μ l/well were plated. Plates were allowed to dry for 48 h. Then, 50 μ l/well of methanol was added for 90 min. Before use, plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20. The plates were then incubated with 100 μ l of serial dilutions of mouse sera in PBS containing 0.05% Tween-20 for 1 h at room temperature. Bound antibodies were detected by incubation with peroxidase-conjugated goat anti-mouse total Ig [IgG+ IgM] (Jackson ImmunoResearch), IgG1, IgG2b or IgG2c antibodies (Southern Biotech) for 1 h at room temperature. The plates were developed with TMB substrate (Invitrogen) and absorbance was measured at 450 nm. The antibody levels in serum were expressed as endpoint titers, the reciprocal of the highest dilution that yielded the background optical density plus 3 times de standard deviation (OD + 3SD).

Ovalbumin (OVA) immunization studies

Mice were infected with *S. suis* WT strain P1/7 (1×10^7 CFU/ml) two days prior immunization with 10 μ g of OVA (Sigma-Aldrich) formulated with 20 μ g of CpG ODN 1826 (Invivogen) as adjuvant. A boost immunization with the same OVA-CpG ODN formulation was given at day 14 post-primary immunization. Serum levels of OVA-specific total Ig, IgG1, IgG2b and IgG2c were measured by ELISA (see below) at 14 and 21 days post-primary immunization (n = 10 per group).

ELISA for OVA specific antibodies

Serum levels of OVA-specific antibodies were determined by ELISA. Briefly, Polysorp Immuno plates were coated overnight at 4 °C with 100 µl of 50 µg/ml of OVA protein in PBS. After blocking for 2 h with 1% casein solution in PBS-0.05% Tween-20, serial dilutions of serum samples were added to the plates and incubated for 1 h at room temperature. After washing, secondary antibodies specific for total Ig and for each IgG subclass were added as described above. Antibody levels in serum were expressed as endpoint titers.

Statistical analysis

Cytokine and FACS data are expressed as mean \pm SEM and analyzed for significance using Student's unpaired *t*-test. Antibody titer levels data were analyzed for significance using ANOVA analysis. All analyses were performed using the Sigma Plot System (v.9; Systat Software). A *P* < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

Encapsulated S. suis induces a type-1 pro-inflammatory environment in the spleen during systemic infection

In order to characterize the immunological environment during *S. suis* systemic infection, an *ex vivo* approach was first used to measure the production of different cytokines in the spleen. Total splenocytes from mice infected with *S. suis* WT strain P1/7 were collected and incubated in cell cultures plates for 48 h. Splenocytes from control (placebo) animals were used as negative controls and ConA-treated splenocytes were used as positive controls. Under these conditions, a significant production of IL-6 and TNF- α as well as high levels of IFN- γ were observed, indicating the progression of a type-1 pro-inflammatory response (Fig. 1). Infected spleen cells also released significant amounts of IL-10, suggesting a role of this regulatory cytokine in maintaining homeostasis during the inflammatory process. Interestingly, the presence of CCL3 and CXCL9, important chemokines involved in T cell recruitment, was observed (Fig. 1). The production of IL-4 was not detected (data not shown).

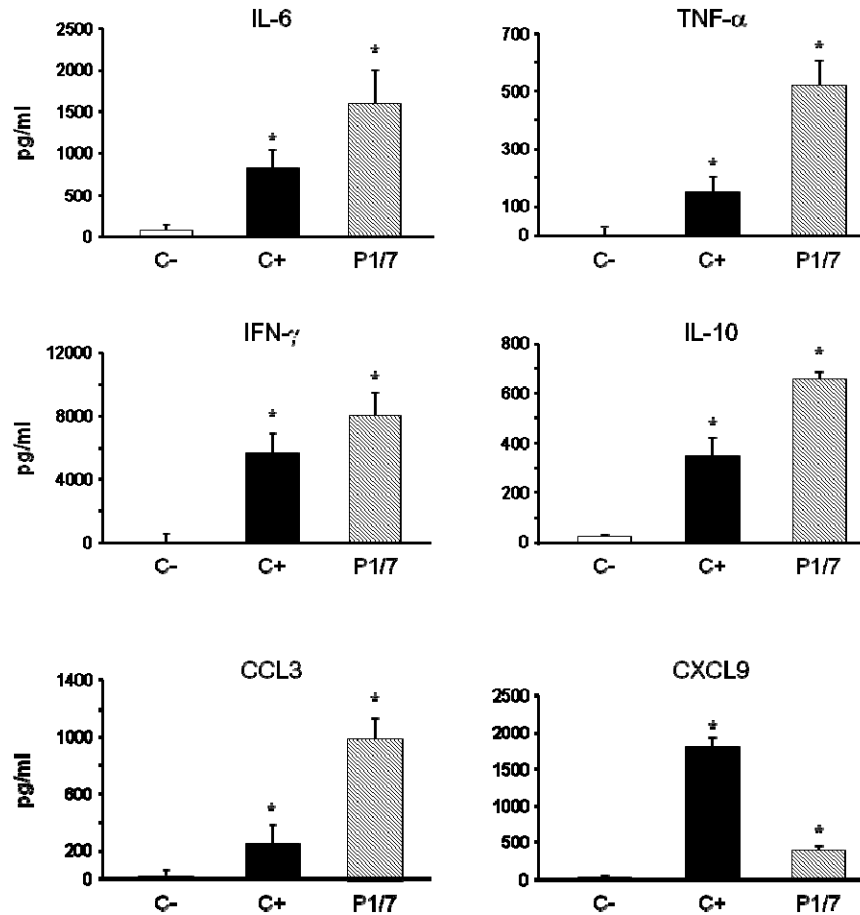


Fig. 1. *Ex vivo* cytokine and chemokine production profiles by total splenocytes in response to *S. suis*.

Mice were infected intra-peritoneally with a dose of 5×10^7 CFU/ml of *S. suis* wild-type strain P1/7 ($n = 3$ per group \times 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h post-infection and total splenocytes plated at 5×10^6 cells/well. After 6 h of incubation, gentamycin was added to the culture to prevent cell toxicity. Cells were then incubated for 48 h and supernatants were collected for cytokine analysis by ELISA. Non-stimulated cells from mock-infected animals served as negative control for basal expression (C-). Cells stimulated with Concanavalin A ($0.1 \mu\text{g/ml}$) were used as positive control (C+). Data are expressed as means \pm SEM (in pg/ml) from 3 different experimental infections. * $P < 0.05$ denotes values that are significantly higher than those obtained with splenocytes from non-infected mice (C-).

*CD4⁺ T cells are involved in the host immune response induced during *S. suis* infection*

CD4⁺ T cells are key players in the development of the host immune responses; however, their activation status and cytokine profile in response to *S. suis* infection has never been investigated. Firstly, we performed a multi-parametric FACS analysis of total splenocyte *ex vivo* production of IFN- γ , a Th1 signature cytokine. As shown in Fig. 2A, IFN- γ production was overall weak and hardly detectable by IC-FACS within the whole spleen cell population. CD3⁺ T cells contributed to ~ 50% of the IFN- γ response in the spleen of infected mice. However, when considering inter- and intra-experiment variations, this weak IFN- γ production was not statistically significant compared to control mice (Fig. 2B). NKT cells (NK1.1⁺ CD3⁺) produced low to negligible levels of IFN- γ (data not shown). Indeed, NK cells (NK1.1⁺) were the major contributors to IFN- γ production within the CD3⁻ population

early during infection (data not shown). As expected, CD19⁺ cells (B cells) did not produce significant levels of this cytokine (data not shown). Similar findings were obtained when analyzing TNF- α production (Fig. 2C).

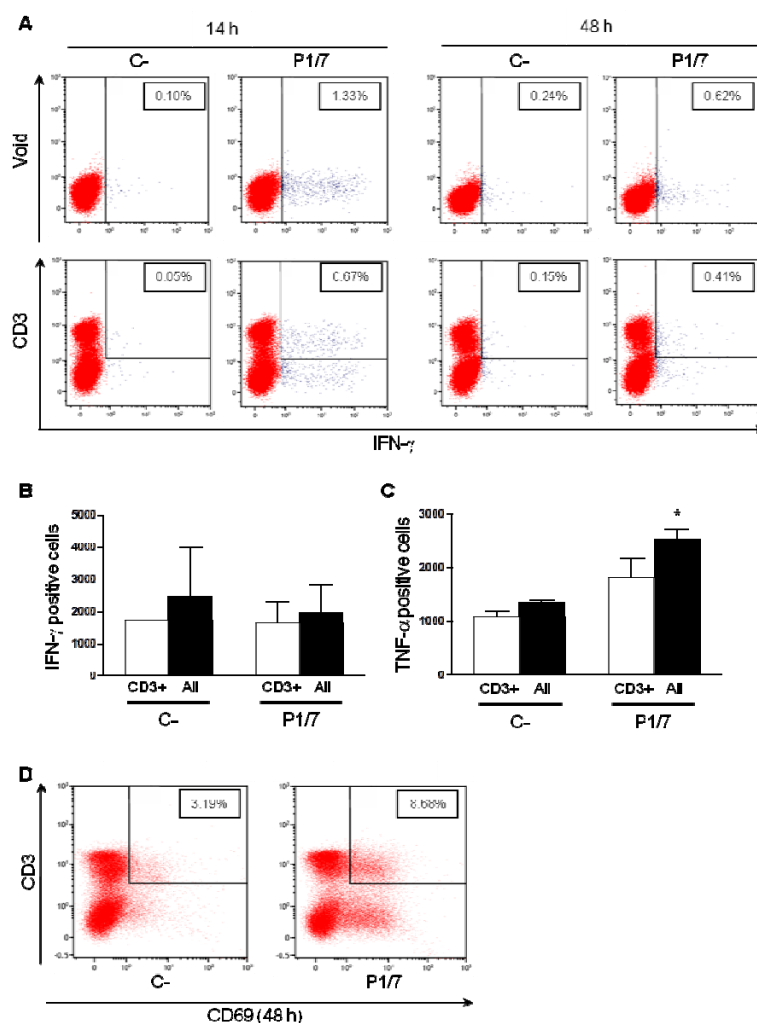
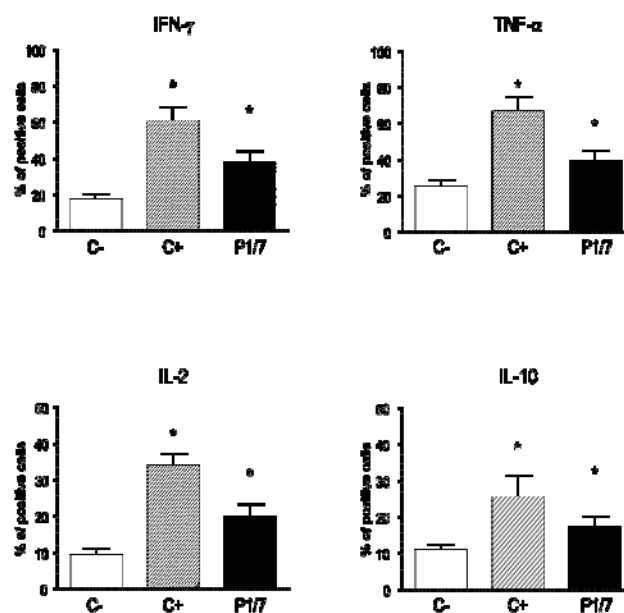


Fig. 2. *Ex vivo* analyses of cellular sources of IFN- γ and CD3⁺ T cell activation during *S. suis* infection.

Mice were infected intra-peritoneally with a dose of 5×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7 ($n = 3$ per group \times 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h post-infection and total splenocytes plated at 5×10^6 cells/well. After 6 h of incubation, gentamycin was added to the culture to prevent cell toxicity. Non-stimulated cells from mock-infected animals served as negative control for basal expression (C-). Total splenocytes were incubated for 14 h or 48 h with brefeldin A (3 μ g/ml) added during the last 5 h of incubation. Cells were harvested and intracellularly stained for IFN- γ or TNF- α (C) or surface stained for CD69 (D) in combination with several surface markers for multi-parametric FACS analysis. (A, D) Representative data from 3 different experimental infections based on CD3+ population or total splenic population (Void). (B, C) Number of either IFN- γ + or TNF- α + cells within the CD3+ population or within total splenic population (All) at 48 h. Data are expressed as means \pm SEM from 3 different experimental infections. * $P < 0.05$, indicates statistically significant difference compared to negative control cells (C-).

Nevertheless, a strong expression of the early leukocyte activation marker CD69 was observed in total splenocytes from infected animals compared to control mice. Around $12.8\% \pm 2.5\%$ of cells expressed this marker within the CD3+ population, suggesting that a small portion of T cells have been activated during infection (Fig. 2D).

As the frequency of activated CD3+ T cells during *S. suis* infection was very low and to better evaluate the role of CD3+CD4+ T cells, these target cells were MACS-isolated from ex-vivo total splenocyte cultures and analyzed by IC-FACS. As shown in Fig. 3, CD4+ T



cells contributed to the release of low, still significant levels of IFN- γ , TNF- α and IL-2. These data suggest that CD4+ T cells indeed differentiate into Th1 cells, however low % of activated cells are observed relatively to ConA-treated cells, used as positive controls. Interestingly, a significant % of IL-10+CD4+ cells was also observed in ex-vivo total splenocyte cultures (Fig. 3).

Fig. 3. Ex vivo analyses of CD4+ T cell contribution to cytokine production.

Mice were infected intra-peritoneally with a dose of 5×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7 ($n = 3$ per group \times 3 individual experimental infections). Spleens were harvested 6 h post-infection and total splenocytes plated at 5×10^6 cells/well. After 6 h of incubation, gentamycin was added to the culture to prevent cell toxicity. Non-stimulated cells from mock-infected animals served as negative control for basal expression (C-). Cells stimulated with Concanavalin A (0.1 μ g/ml) were used as positive control (C+). Total splenocytes were incubated for 48 h. Brefeldin A (3 μ g/ml) was added during the last 5 h of incubation and CD4⁺ T cells were MACS-isolated from the culture, stained intracellularly for different cytokines and analyzed by FACS. Data are expressed as mean \pm SEM (in % of positive cells) from 3 individual experimental infections. * $P < 0.05$, indicates statistically significant difference compared to negative control cells (C-).

With the aim to measure the frequency and level of activation of CD4⁺ T cells *in vivo* during infection, mice were injected i.p. with Brefeldin A solution and CD4⁺ T cells were directly isolated from the spleen 96 h post-primary infection. The % of IFN- γ +CD4⁺ cells were very low after a primary infection and not significantly different than controls. On the other hand, *in vivo* production of TNF- α and IL-2 by CD4⁺ T cells was significantly higher than controls cells (Fig. 4). Similarly to *ex vivo* data, a significant production of IL-10 by CD4⁺ cells was also observed *in vivo* during *S. suis* primary infection. Surviving mice were challenged with a second infectious dose 2 weeks after primary infection and similarly treated with Brefeldin A. When CD4⁺ T cells were isolated 48 h post-boost, % of IFN- γ +, TNF- α +, IL-2+ and IL-10+ CD4⁺ cells were similar, or only slightly higher, than those observed 96 h post-primary infection (Fig. 4), suggesting a poor generation of CD4⁺ memory T cells during *S. suis* infection.

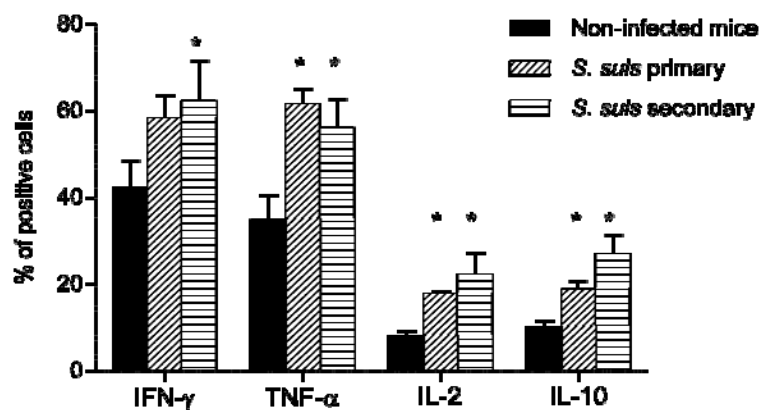


Fig. 4. *In vivo* CD4⁺ T cell contribution to cytokine production during primary and secondary *S. suis* infections.

Mice were infected intra-peritoneally with a dose of 1×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7. Surviving animals who had previously displayed clinical symptoms were boosted with a second dose of 1×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7 two weeks after initial infection. Spleens of animals with clinical symptoms and positive bacteremia were harvested 96 h post-primary infection or 48 h post-boost infection ($n = 2$ per group \times 5 individual experimental infections). Five hours prior to spleen collection, mice were injected with Brefeldin A (200 μ g). Non-infected control animals were similarly treated. Spleen CD4⁺ T cells were MACS-purified, stained intracellularly for different cytokines and analyzed by FACS. Cytokine basal expression levels in non-infected animals were similar at 96 h post-primary mock-infection and 48 h post-secondary mock-infection. Data from the latter time point were selected for the figure. Data are expressed as mean \pm SEM (in % of positive cells) from 5 individual experimental infections. * $P < 0.05$, indicates statistically significant difference compared to non-infected mice.

Reduced numbers of CD4⁺ T cells after S. suis infection

To better understand the dynamics of T cell activation *in vivo*, total numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells were quantified during the *S. suis* infection. Spleens from control and infected mice were collected 2, 4, 6, and 8 d post-primary infection and 2, 4, and 6 d post-boost infection. Similar % of CD4⁺ T cells were observed between infected and non-infected controls during the first 6 d post-primary infection (data not shown). However, a significant

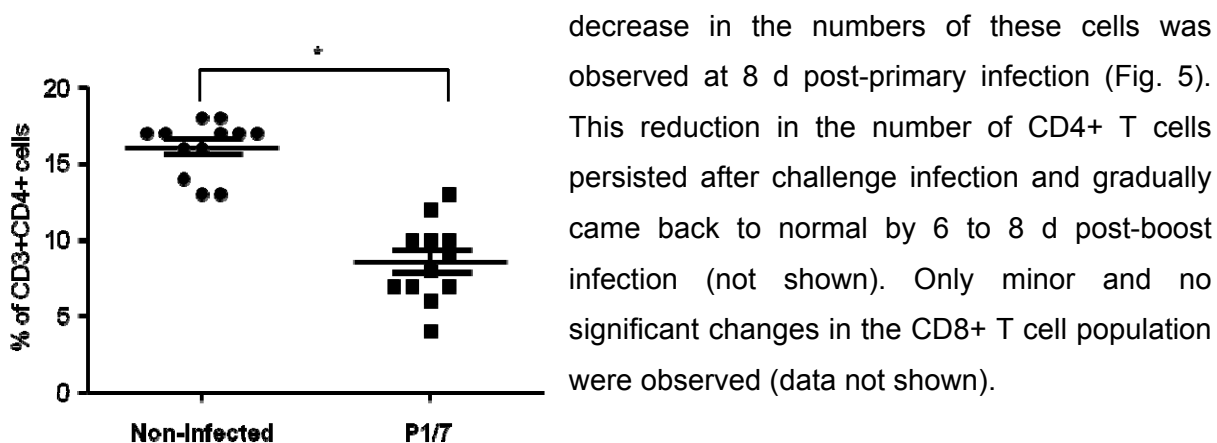


Fig. 5. Numbers of splenic CD4⁺ T cells during *S. suis* primary infection.

Mice ($n = 4$ per group \times 3 individual experimental infections) were infected intra-peritoneally with a dose of 1×10^7 CFU of *S. suis* wild-type strain P1/7. Non-infected control animals were also included. At 8 days post-infection, % of CD3+CD4⁺ T cells were evaluated by FACS from the

spleens of infected and control animals. * $P < 0.05$, indicates statistically significant difference compared to non-infected mice.

S. suis CPS impairs cytokine release by T cells

Previous experiments showed that albeit CD4⁺ cells are involved in the immune response induced during *S. suis* infection, their activation status seem to be compromised. To better characterize the effect of *S. suis* on CD4⁺ T cell functions we performed *in vitro* DC-T cell co-cultures. As *S. suis* is a well encapsulated bacteria, we also evaluated the impact of CPS on the activation of CD4⁺ T cells *in vitro*, using non-encapsulated mutant strain. Supernatants from co-culture experiments were collected and tested by ELISA for the presence of CD4⁺ T cell-derived cytokines. The WT strain P1/7 induced the release of low, but significant levels of TNF- α and IFN- γ . Low levels of IL-10 release by CD4⁺ T cells were also observed in response to WT *S. suis* activation *in vitro* (Fig. 6). In contrast to WT *S. suis*, the non-encapsulated mutant strain $\Delta cpsF$ induced significantly higher levels of TNF- α , IFN- γ and IL-10 by CD4⁺ T cells.

Compared to other cytokines, *S. suis*-activated CD4⁺ T cells released large amounts of IL-2, and this production was not affected in co-cultures stimulated with the $\Delta cpsF$ mutant strain (Fig. 6). These results suggest that *S. suis* CPS modulates CD4⁺ T cell activation without effecting autocrine IL-2 secretion.

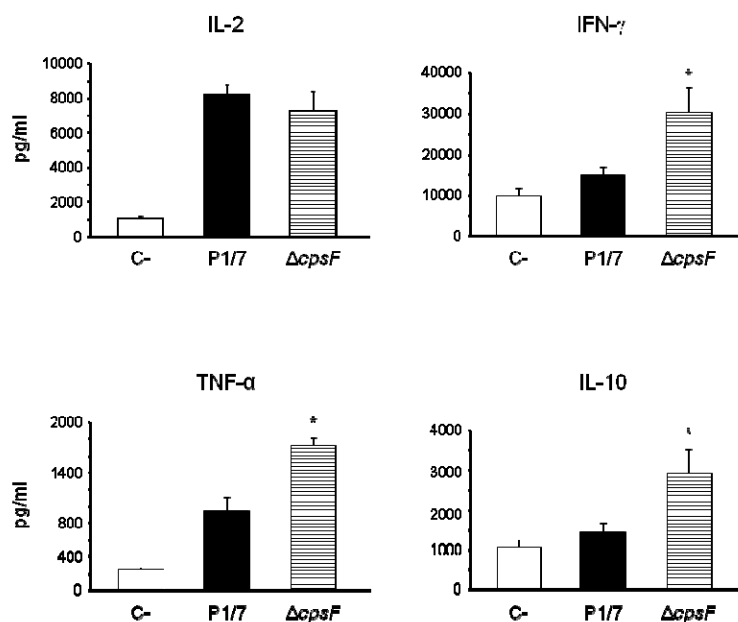


Fig. 6. Role of bacterial capsular polysaccharide in the modulation of cytokine production by CD4⁺ T cells.

Dendritic cells (DCs) were infected with either wild-type *S. suis* strain P1/7 or its non-encapsulated isogenic mutant $\Delta cpsF$ (MOI 1:1) for 1 h. Extracellular bacteria were killed by antibiotic treatment and cultures washed prior to addition of freshly isolated splenic CD4⁺ T cells

from naïve mice (T cell: DC ratio of 5:1). Co-cultures were incubated for 48 h, resuspended in fresh medium containing 10 ng/ml of IL-2 for 72 h (resting period) and then transferred to anti-CD3 coated plates for 48 h. Supernatants were then collected and cytokines quantified by ELISA. Non-stimulated co-cultures served as negative controls (C-) for basal expression. Data are expressed as means \pm SEM (in pg/ml) from 5 different experiments. [#] $P < 0.05$, indicates statistically significant differences compared to negative controls (C-). ^{*} $P < 0.05$, indicates statistically significant differences between co-cultures infected with wild-type strain P1/7 and those infected with the non-encapsulated mutant $\Delta cpsF$.

S. suis interferes with T cell expression of co-stimulatory molecules

In addition to cytokine production, expression of surface molecules on CD4⁺ T cells is an essential event for proper T cell activation. To measure the ability of *S. suis* to induce optimal activation of CD4⁺ T cells, we measure surface expression of CD69 and CD40L. Fig. 7A shows that *S. suis* failed to induce a significant increase in surface expression of these molecules *in vitro*, compared to uninfected control cells. Co-cultures infected with the non-encapsulated mutant strain $\Delta cpsF$ showed a low increase in CD69 expression by T cells; however levels of CD40L expression remained unchanged (Fig. 7B). Similar results were observed independently of the incubation time (3, 8, 24 and 48 h of co-culture incubation, not shown).

S. suis induces a weak specific antibody response

As CD4⁺ cells play a major role in B cell activation and thus in the generation of a specific humoral response, the anti-*S. suis* antibody response generated during infection was evaluated. Blood from infected mice was collected 14 days after primary infection. As shown in Fig. 8, titers of total Ig [IgG+ IgM] directed against the whole bacteria were relatively low, when compared to those obtained after an immunization with OVA (see Fig. 9). Nevertheless, isotype switching was observed in infected animals. In agreement with a Th1 profile, levels of *S. suis*-specific antibodies of the type 1 IgG subclasses (IgG2b and IgG2c) were higher than those of the Type 2 IgG1 subclass (Fig. 8).

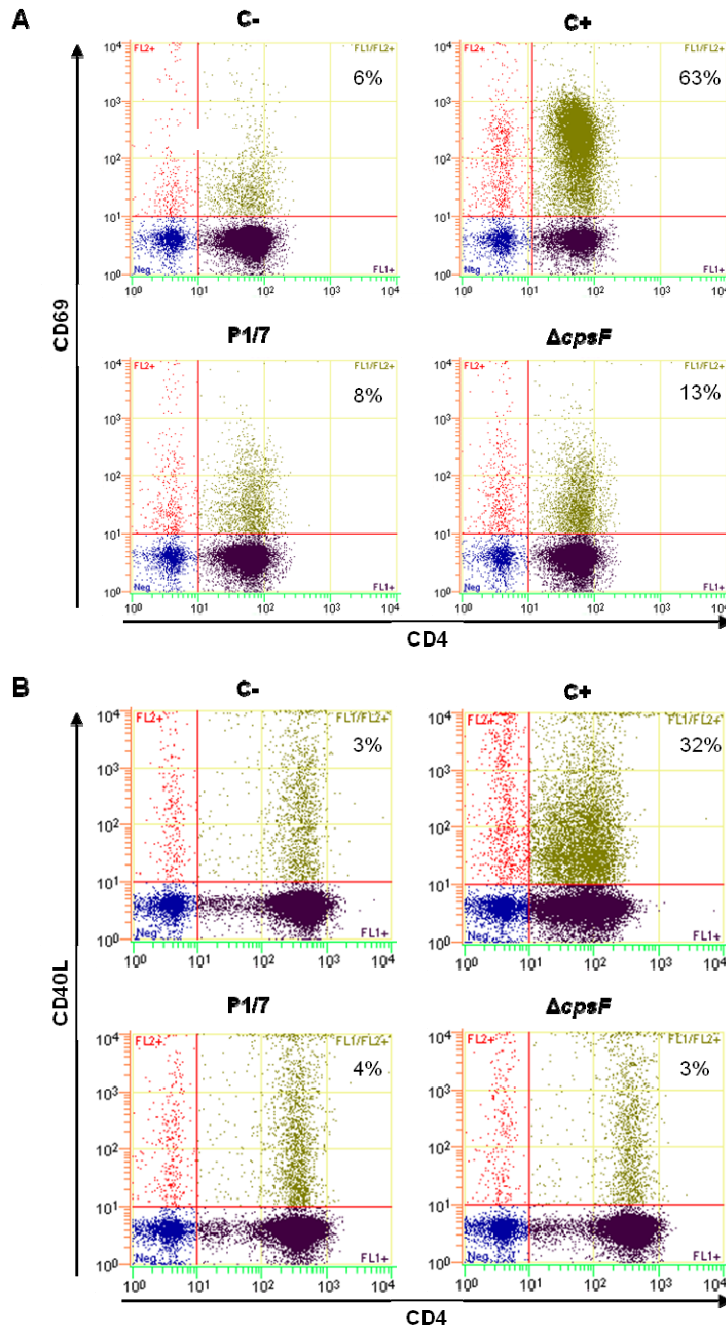


Fig. 7. Role of bacterial capsular polysaccharide in the modulation of CD4⁺ T cell surface expression of CD69 and CD40L.

Dendritic cells (DCs) were infected with either wild-type *S. suis* strain P1/7 or its non-encapsulated isogenic mutant $\Delta cpsF$ (MOI 1:1) for 1 h. Extracellular bacteria were killed by antibiotic treatment and cultures washed prior to addition of freshly isolated splenic CD4⁺ T cells from naïve mice (T cell: DC ratio of 5:1). Co-cultures were incubated for 8 h, cells harvested and CD69 (A) or CD40L (B) expression analyzed by FACS. Co-cultures incubated with medium

alone served as negative controls (C-). Co-cultures treated with either Concanavalin (0.1 $\mu\text{g/ml}$) or phorbol myristate acetate *S. suis* interferes with the OVA-specific antibody response in vivo (15 ng/ml) + ionomycin (150 ng/ml) served as positive controls (C+) for CD69 and CD40L expression, respectively. Twenty thousand gated events were acquired per sample. Quadrants were drawn based on FITC- and PE-control stains. Representative data from 3 different experiments. Numbers in the upper quadrants indicate the % of CD4+CD69+ or CD4+CD40L+cells.

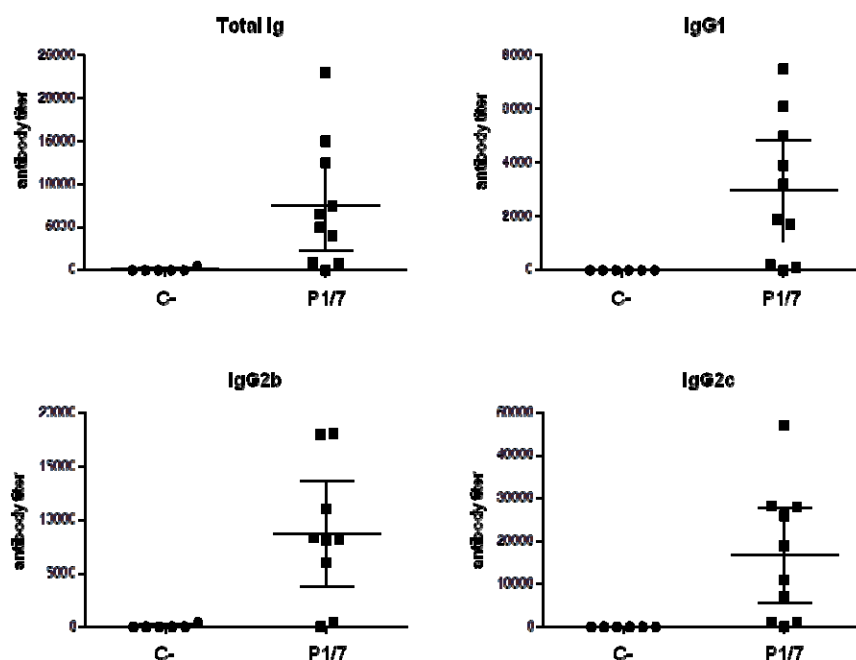


Fig. 8. Serum levels of *S.-suis* specific antibodies in infected animals.

Mice ($n = 10$) were infected with *S. suis* wild-type strain P1/7 (1×10^7 CFU/ml) and sera collected two weeks post-infection. Total Ig [IgG+IgM], IgG1, IgG2b and IgG2c anti-*S. suis* titers were determined by ELISA. C- represents a pool of control mice ($n = 6$) injected with vehicle solution.

S. suis interferes with the OVA-specific antibody response in vivo

To better understand the overall low antibody response generated during a *S. suis* infection, the capacity of *S. suis* to interfere with the development of the antibody response against a bystander antigen was evaluated. C57BL/6 mice were infected with *S. suis* WT strain P1/7 two days prior the injection of OVA formulated with CpG ODN. Two weeks after primary OVA immunization, serum levels of OVA-specific total Ig, IgG1, IgG2b and IgG2c

were found significantly lower following mice infection with *S. suis* compared to non-infected mice (Fig. 9A). Surviving mice were then boosted with a second dose of OVA to evaluate the effect of *S. suis* infection on the development of anti-OVA memory antibody response. A significantly lower production of total Ig, IgG1 and IgG2b was also observed after boost (Fig. 9B), while no difference was measurable in the case of IgG2c.

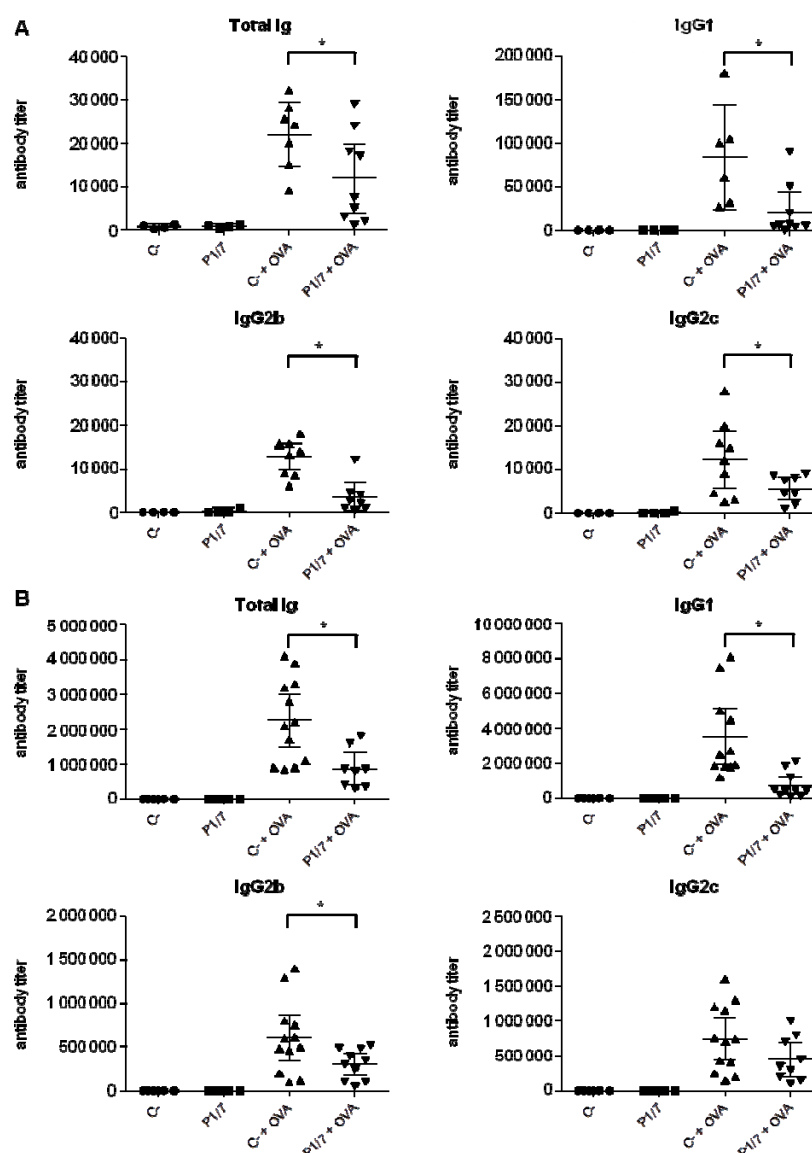


Fig. 9. Effect of *S. suis* on the production of ovalbumin (OVA)-specific antibodies.

Mice ($n = 10$) were infected with *S. suis* wild-type strain P1/7 (1×10^7 CFU/ml) two days prior immunization with 10 μ g of OVA formulated with 20 μ g of CpG ODN as adjuvant. A boost immunization with the same OVA-CpG ODN formulation was given at day 14 post-primary immunization. Serum levels of OVA-specific total Ig [IgG+IgM], IgG1, IgG2b and IgG2c were measured by ELISA at 14 (A) and 21 (B) days post-primary immunization. C- represents control mice injected with vehicle solution only ($n = 6$). C- + OVA represents control mice injected with vehicle solution followed by OVA immunization under the same protocol as described above ($n = 10$). A control group infected with *S. suis* wild-type strain P1/7 only was also included ($n = 10$). *

$P < 0.05$ denotes values that are significantly lower in pre-infected animals (P1/7 + OVA) compared to the non-infected, immunized animals (C- + OVA).

*Diminished OVA-specific antibody responses correlates with *S. suis*-induction of clinical signs in mice*

In spite of similar bacteremia levels, during a *S. suis* infection some animals displays severe clinical signs while others present milder symptoms. A correlation analysis was thus performed between the presence of severe clinical signs in infected animals and the

production of OVA-specific antibodies during the primary response. Effectively, as shown in Fig. 10, the anti-OVA antibody production was significantly lower when the infected animals displayed severe clinical signs compared to the infected animals with milder clinical signs.

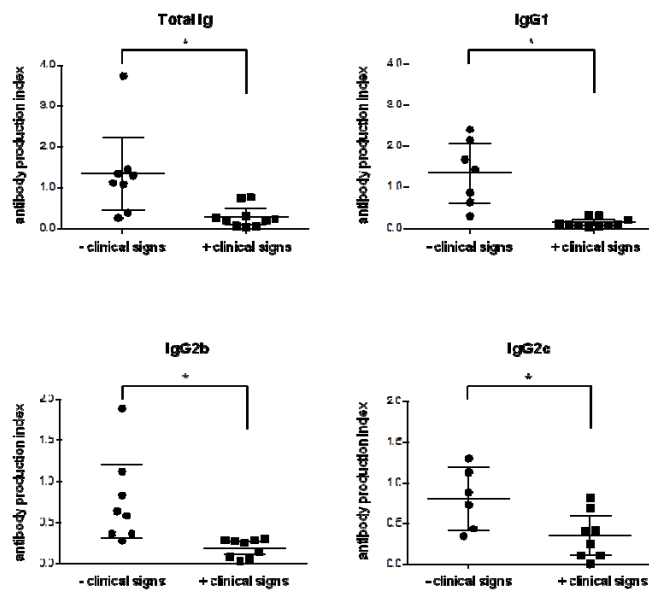


Fig. 10. Correlation between serum levels of OVA-specific antibodies and clinical signs developed by *S. suis*-infected mice.

Mice ($n = 10$) were infected with *S. suis* wild-type strain P1/7 (1×10^7 CFU/ml) two days prior immunization with 10 μ g of OVA formulated with 20 μ g of CpG ODN as adjuvant. Serum levels of OVA-specific total Ig [IgG+IgM], IgG1, IgG2b and IgG2c were measured by ELISA at 14 days post-primary immunization. * $P < 0.05$ denotes values that are significantly lower in infected animals presenting severe clinical signs compared to infected animals presenting mild clinical signs.

Discussion

The mechanisms involved in the innate and adaptive immune responses toward *S. suis* remain essentially poorly known, and the increase in severity of *S. suis* infections in humans underscores the critical need of a better understanding of the interactions between *S. suis* and the immune system to generate an effective immune response against this pathogen. DCs are activated in the presence of *S. suis*, undergoing a maturation process characterized by the up-regulation of costimulatory molecules and the production of pro-inflammatory mediators (7-10). However, *S. suis* was previously shown to possess several virulence factors able to modulate such DC functions, potentially leading to a diminished or ineffective host immune response (7-10). In the present work, we attempted to further evaluate the consequences of *S. suis* modulation of DC functions on the development of adaptive immune responses toward this pathogen. This study addresses for the first time the contribution of CD4⁺ T cells in the development of immune functions during *S. suis* serotype 2 infections using *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* analyses.

In general, T cells seem to be essential for the development of the host adaptive immune response. A preliminary experiment conducted in our laboratory with TCR $\alpha\beta$ KO mice showed that mice devoided of functional CD4 and CD8 T cells die significantly more rapidly than control mice, suggesting an important role for T cells during *S. suis* infection (unpublished observations). This prompted us to further evaluate the role of CD4⁺ T cells during *S. suis* infection.

An experimental model of *S. suis* systemic infection has previously been described in our laboratory (12). During the systemic phase of the infection, among other cytokines, high serum levels of IL-6, TNF- α , IFN- γ and IL-10 were observed (12, 15). In this study, total spleen cells were shown to secrete TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10, CCL3 and CXCL9, suggesting an activation of splenic cells during the infection and a polarization towards a Th1 response. IL-10 production can be related to immune regulation, while the presence of CCL3 and CXCL9 suggests that T cells might be recruited in the spleen through the release of these chemokines, as is the case for other streptococci (16). It is interesting to note that TNF- α and IL-6 have routinely been reported as important mediators of *S. suis* sepsis (12, 15). This observation might also highlight the particular importance of IL-10 in maintaining homeostasis as reported by Dominguez-Punaro *et al.* (15). Similar experiments were

conducted in parallel with Group B *Streptococcus* (GBS), a pathogen often compared to *S. suis*. Indeed, GBS is also encapsulated and cause invasive infection leading to sepsis and meningitis as is the case of *S. suis*. Furthermore, GBS and *S. suis* are the sole Gram-positive bacteria harbouring terminal sialic acid in their CPSs. In spite of expected similarities, the production of these cytokines and chemokines in the spleens of *S. suis*-infected mice was much lower than observed in GBS-infected mice under the same experimental conditions (Clarke *et al.*, submitted for publication).

CD4⁺ T cells are expected to be major contributors to cytokine release and to shape the ensuing adaptive immune response that follows the initial innate inflammatory response to systemic bacteria (17). Multiple *ex vivo* and *in vivo* analyses of either total splenocytes, CD3⁺ T cells or CD3⁺CD4⁺ T cells suggested the development of a Th1 response after *S. suis* infection. However, frequency of activated CD4⁺ T cells and levels of IFN- γ , TNF- α and IL-2 were very low. IL-10 production by CD4⁺ T cells activated by *S. suis* was also observed. Besides Treg, IL-10 production has been reported by both Th1 and Th2 differentiated T cells (18). IL-4 production by CD4⁺ T cells was not detected in our system. The very acute course of the *S. suis* infection might suggest that CD4⁺IL-10⁺ cells are generated during the type-1 inflammatory process rather than the expansion or generation of a particular Treg population.

The development of immune memory was also evaluated. Two weeks after primary infection, surviving animals were challenged with a second infection. Results showed that CD4⁺ T cells responded to infection by producing the same pattern of cytokines. However, this response was engaged much more rapidly as CD4⁺ T cells were isolated and stained 48 h after challenge in comparison to 96 h for the initial infection. Yet, levels of cytokine production were similar to those observed after a primary infection, suggesting a limited development of a memory response.

S. suis possesses a thick CPS known to be its most important virulence factor. The presence of CPS in *S. suis* is known to hide cell wall antigens and thus reduce cell activation (7-9, 12). Previous studies with DCs showed that the CPS modulates DC functions, mostly by interfering with *S. suis* internalization and killing by DCs and with DC activation (7-9). In order to characterize the role of *S. suis* CPS in the activation of CD4⁺ T cells, an *in vitro* model was used. *In vivo* studies could not be performed as the mutant strain is rapidly

eliminated from the host (13, 19). The CPS was found to interfere with the release of IFN- γ , TNF- α and IL-10 by CD4⁺ T cells. However, the CPS has no effect on the release of IL-2, suggesting that the presence of the CPS interferes with CD4⁺ T cell activation, but not with T cell proliferation. CD69 is the earliest leukocyte maturation marker and is routinely used to evaluate T cell activation (20). However, it has been described that CD69-deficient lymphocytes had a normal proliferative response (20). In the case of *S. suis*, only low expression of CD69 by *in vitro* activated CD4⁺ T cells was observed. This is in contrast with *Streptococcus pneumoniae* which induces an up-regulation of CD69 on T cells during the infection (21). *S. suis* also failed to induce significant levels of surface expression of CD40L, an important costimulatory molecule involved in T cell activation. The CPS does not seem to interfere with CD69 or CD40L expression by *S. suis*-stimulated CD4⁺ T cells. Altogether, these findings suggest that *S. suis* uses multiple virulence factors to reduce either cytokine release or costimulatory molecule expression by CD4⁺ T cells.

During the infection, we also observed that the production of *S. suis*-specific antibodies is low. This prompted us to evaluate the ability of *S. suis* to interfere with the production of antibodies against a bystander antigen. OVA, in formulation with CpG ODN, was injected in infected mice. The production of both Th1- and Th2-dependent antibody isotypes was markedly reduced during the primary infection. The same results were obtained during the memory response, except for the production of IgG2c, for which no significant difference was noticeable. IgG2c is strongly associated with the development of a Th1 response. As CpG has a strong Th1 adjuvant activity (22), this could explain why a significant difference during the memory response was difficult to be observed.

Another major finding of this work is the correlation between the presence of clinical signs and the production of antibodies against OVA. After the infection with *S. suis*, animals developed a bacteremia accompanied by either mild or severe clinical signs such as rough hair coat, swollen eyes, depression, prostration and weakness. During the primary infection, infected animals displaying severe clinical signs were shown to produce significantly less OVA-specific antibodies compared with animals presenting mild clinical signs. These results suggest that *S. suis* has immunosuppressive properties. The exact mechanisms responsible for the suppression of the immune response during *S. suis* infection will need further investigations. However, such observations have already been described for *S. pneumoniae* (23). In effect, it has previously been demonstrated that *S. pneumoniae* inhibits IgG

responses to a number of coimmunized soluble antigens. More precisely, *S. pneumoniae* was found to mediate a significant reduction in the formation of Ag-specific splenic germinal center T follicular helper and germinal center B cells and antibody-secreting cells in the spleen and bone marrow in response to OVA (23). In this regard, a transient depletion of CD4⁺ T cells in the spleens was observed during a primary *S. suis* infection. It is unknown if this is related to cell death or cell emigration to other target tissues or organs.

To conclude, we observed that total splenocytes produce IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10, CCL3 and CXCL9. Different cells such as macrophages, NK cells, and DCs could be involved in the release of these cytokines. The presence of CCL3 and CXCL9 could be involved in the recruitment of CD4⁺ T cells. In effect, we demonstrated the production of TNF- α , IFN- γ , IL-10, and IL-2 by CD4⁺ T cells, suggesting the development of a Th1 response. However, *S. suis* CPS interferes with CD4⁺ T cell activation, while having no impact on T cell proliferation. Finally, *S. suis* also hampers the development of specific antibodies during the infection. Animals hampered in antibody production are the one displaying the most severe clinical signs. This study is a noteworthy starting point for future research regarding T-cell dependent immunity during *S. suis* infection and the consequences in vaccine development.

Acknowledgements

We thank Sonia Lacouture for technical help.

References

1. **Gottschalk M, Segura M.** 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* **76**:259-272.
2. **Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M.** 2010. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiol* **5**:371-391.
3. **Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M.** 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol* **7**:259-279.
4. **Steinman RM.** 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**:271-296.
5. **McKinstry KK, Strutt TM, Swain SL.** 2010. Regulation of CD4⁺ T-cell contraction during pathogen challenge. *Immunol Rev* **236**:110-124.
6. **Knosp CA, Johnston JA.** 2012. Regulation of CD4⁺ T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins. *Immunology* **135**:101-111.

7. **Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, et al.** 2011. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *J Infect Dis* **204**:919-929.
8. **Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, Rivest S, Gottschalk M.** 2012. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells. *PLoS One* **7**:e44746.
9. **Lecours MP, Segura M, Lachance C, Mussa T, Surprenant C, et al.** 2011. Characterization of porcine dendritic cell response to *Streptococcus suis*. *Vet Res* **42**:72.
10. **Meijerink M, Ferrando ML, Lammers G, Taverne N, Smith HE, et al.** 2012. Immunomodulatory effects of *Streptococcus suis* capsule type on human dendritic cell responses, phagocytosis and intracellular survival. *PLoS One* **7**:e35849.
11. **Vanier G, Segura M, Lecours MP, Grenier D, Gottschalk M.** 2009. Porcine brain microvascular endothelial cell-derived interleukin-8 is first induced and then degraded by *Streptococcus suis*. *Microb Pathog* **46**:135-143.
12. **Dominguez-Punaro MC, Segura M, Plante MM, Lacouture S, Rivest S, et al.** 2007. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* **179**:1842-1854.
13. **Lecours MP, Fittipaldi N, Takamatsu D, Okura M, Segura M, et al.** 2012. Sialylation of *Streptococcus suis* serotype 2 is essential for capsule expression but is not responsible for the main capsular epitope. *Microbes Infect* **14**:941-950.
14. **Stockinger B, Zal T, Zal A, Gray D.** 1996. B cells solicit their own help from T cells. *J Exp Med* **183**:891-899.
15. **Dominguez-Punaro Mde L, Segura M, Radzioch D, Rivest S, Gottschalk M.** 2008. Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. *Infect Immun* **76**:3901-3910.
16. **Veckman V, Miettinen M, Matikainen S, Lande R, Giacomini E, et al.** 2003. Lactobacilli and streptococci induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis. *J Leukoc Biol* **74**:395-402.
17. **Oh H, Ghosh S.** 2013. NF-kappaB: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. *Immunol Rev* **252**:41-51.
18. **Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, et al.** 2013. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol* **4**:129.
19. **Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, Gottschalk M.** 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* **144** (Pt 2):325-332.
20. **Lauzurica P, Sancho D, Torres M, Albella B, Marazuela M, et al.** 2000. Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice. *Blood* **95**:2312-2320.
21. **LeMessurier K, Hacker H, Tuomanen E, Redecke V.** 2010. Inhibition of T cells provides protection against early invasive pneumococcal disease. *Infect Immun* **78**:5287-5294.
22. **Klinman DM, Currie D, Gursel I, Verthelyi D.** 2004. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev* **199**:201-216.
23. **Saumyaa, Arjunaraja S, Pujanauski L, Colino J, Torres RM, et al.** 2013. Immunosuppressive property within the *Streptococcus pneumoniae* cell wall that inhibits generation of T follicular helper, germinal center, and plasma cell response to a coimmunized heterologous protein. *Infect Immun* **81**:3426-3433.